



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE HYDROGELŮ NA BÁZI
KATIONAKTIVNÍHO BIOPOLYMERU**

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF HYDROGELS BASED ON CATIONIC BIOPOLYMER

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Barbora Tesařová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0994/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Barbora Tesařová**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název diplomové práce:

Příprava a charakterizace hydrogelů na bázi kationaktivního biopolymeru

Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat rešerši zaměřenou na tématu přípravy a charakterizace hydrogelů.
2. Na základě rešerše vybrat vhodnou dvojici polyelektrolyt/síťovací činidlo.
3. Připravit a následně vhodnými metodami charakterizovat vybrané hydrogely.
4. Diskutovat vliv základních fyzikálně-chemických parametrů na finální vlastnosti hydrogelů.

Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Barbora Tesařová
student(ka)

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá přípravou a charakterizací hydrogelů na bázi kationaktivního biopolymeru a anionaktivního tenzidu. Jakožto vhodný zástupce kationaktivního polymeru byl zvolen chitosan, díky jeho biokompatibilitě a biodegradabilitě, a *N,N,N*-trimethylchitosan, který byl v rámci závěrečné práce syntetizován z chitosanu. Výsledný produkt syntézy byl charakterizován pomocí SEC-MALS, elementární analýzy, infračervené spektroskopie a nukleární magnetické rezonance. U tohoto biopolymeru a jeho methylovaného ekvivalentu byly zkoumány jejich interakce se zástupci anionaktivních tenzidů, a to dodecylsulfátu sodného a tetradecylsulfátu sodného. Hlavní metodou této práce byla reologie, pomocí níž byly studovány připravené hydrogely chitosanu s tenzidy i připravené mikrogely *N,N,N*-trimethylchitosanu s tenzidy. Interakce mezi polymery a tenzidy tedy byly prokázány.

ABSTRACT

Presented thesis deals with the preparation and characterization of hydrogels based on positively-charged biopolymer and negatively-charged tenside. As an appropriate representative of positively-charged polymer was chosen chitosan, because of his biocompatibility and biodegradability, and *N,N,N*-trimethylchitosan, which was synthesised from chitosan in this diploma thesis. The final product of synthesis was characterised by SEC-MALS, elemental analysis, infrared spectroscopy and nuclear magnetic rezonation. Interactions between these polymers and representatives of negatively-charged tensides, which are sodium dodecylsuphate and sodium tetradecylsulphate, were investigated. The main method used in this thesis was rheology, through it were investigated prepared hydrogels based on chitosan and tensides and also prepared microgels based on *N,N,N*-trimethylchitosan and tensides. The interactions between polymers and tensides have been proved.

KLÍČOVÁ SLOVA

chitosan, *N,N,N*-trimethylchitosan, methylation, hydrogel, reologie, interakce, tenzidy

KEY WORDS

chitosan, *N,N,N*-trimethylchitosan, methylation, hydrogel, rheology, interactions, tensides

TESAŘOVÁ, B. *Příprava a charakterizace hydrogelů na bázi kationaktivního biopolymeru*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 93 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Jiří Smilek, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího práce a děkana FCH VUT.

.....

Barbora Tesařová

Děkuji vedoucímu práce Ing. Jiřímu Smilkovi Ph.D. za cenné rady, trpělivost a především za věnovaný čas. Také bych chtěla poděkovat Ing. Sabíně Jarábkové za podnětné konzultace a Ing. Jozefu Krajčovičovi Ph.D. za pomoc při syntéze N,N,N-trimethylchitosanu. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Michalu Kalinovi Ph.D. za pomoc a ochotu při měření SEC-MALS a v neposlední řadě Ing. Vojtěchu Enevovi Ph.D. za pomoc a konzultace při měření infračervené spektroskopie a elementární analýzy.

OBSAH

1	ÚVOD.....	7
2	CÍL PRÁCE.....	8
3	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
3.1	Polyelektrolyty	9
3.2	Chitosan.....	9
3.2.1	Historie a struktura chitosanu.....	9
3.2.2	Vlastnosti chitosanu	11
3.2.3	Výskyt a výroba chitosanu	12
3.2.4	Využití chitosanu.....	13
3.2.5	<i>N,N,N</i> - trimethylchitosan.....	14
3.3	Tenzidy.....	18
3.3.1	Dodecylsulfát sodný (SDS).....	19
3.3.2	Tetradecylsulfát sodný (STS).....	20
3.3.3	Tvorba micel	20
3.3.4	Solubilizace	23
3.3.5	Interakce polyelektrolyt–tenzid.....	23
3.4	Gelové systémy	25
3.4.1	Vznik gelů	25
3.4.2	Vlastnosti gelů.....	27
3.4.3	Hydrogely.....	28
3.4.4	Využití gelů.....	28
3.5	Reologie.....	29
3.5.1	Reologie gelů.....	30
3.5.2	Měřicí systémy	31
4	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	33
4.1	Studium interakcí chitosanu se záporně nabitými tenzidy a následné využití těchto interakcí	33
4.2	Studium interakcí <i>N,N,N</i> -trimethylchitosanu a následné využití těchto interakcí	39
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
5.1	Použité chemikálie	40
5.2	Charakterizace chitosanů.....	41

5.2.1	Velikostně vylučovací chromatografie-statický rozptyl světla měřený ve více úhlech (SEC-MALS)	41
5.3	Syntéza <i>N,N,N</i> -trimethylchitosanu	41
5.4	Charakterizace <i>N,N,N</i> -trimethylchitosanu	43
5.4.1	SEC-MALS	43
5.4.2	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	43
5.4.3	Elementární analýza	43
5.4.4	Nukleární magnetická rezonance	44
5.5	Příprava hydrogelů	45
5.5.1	Příprava zásobních roztoků	45
5.5.2	Metody přípravy hydrogelů	45
5.6	Reologie	46
6	DISKUZE A VÝSLEDKY	49
6.1	Charakterizace chitosanů	49
6.2	Charakterizace <i>N,N,N</i> -trimethylchitosanu	50
6.2.1	SEC-MALS	50
6.2.2	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	50
6.2.3	Elementární analýza	53
6.2.4	Nukleární magnetická rezonance	53
6.2.5	Závěr charakterizace <i>N,N,N</i> -trimethylchitosanu	56
6.3	Charakterizace hydrogelů	56
6.3.1	Vizuální charakterizace	56
6.3.2	Reologie	64
7	ZÁVĚR	78
8	POUŽITÁ LITERATURA	83
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	91
9.1	Použité zkratky	91
9.2	Použité symboly	93

1 ÚVOD

Problematika interakcí polymeru s tenzidem je stále velmi aktuálním tématem, kterým se zabývá celá řada vědeckých týmů. Volbou vhodné dvojice polyelektrolyt/tenzid o správné koncentraci a vhodně zvolených experimentálních podmínkách (např.: pH, iontová síla aj.) lze připravit fázově separovaný fyzikální hydrogel.

Tato práce se věnuje přípravě gelových systémů založených na kationaktivním polymeru a anionaktivním tenzidu. Takto připravené fyzikální gely nabízí široké pole potenciálního využití. V oblasti medicínských aplikací roste využití polymerů jakožto biodegradabilních nosičů léčiv, které slouží k pomalému uvolňování účinné složky, zvyšování rozpustnosti a vylepšení možností cíleného podávání. Modelovým kationaktivním polymerem byl v této práci zvolen chitosan, který disponuje vynikajícími biologickými vlastnostmi, mezi které patří jeho netoxicity, biokompatibilita či biodegradabilita. Nemodifikovaný chitosan je však při pH 7 nerozpustný a antibakteriálně neúčinný, proto je v současné době věnována velká pozornost přípravě jeho rozpustných solí. Rozpustnost se zvyšuje jak kvarternizací, tak hydrofilní substitucí, kvarternizace dusíku aminoskupiny však patří k nejčastějším modifikacím. Součástí této práce je tedy i syntéza *N,N,N*-trimethylchitosanu a jeho následná charakterizace pomocí těchto analytických metod: SEC-MALS, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, elementární analýza a nukleární magnetická rezonance.

Proces gelace zajišťovaly elektrostatické interakce mezi chitosanem a opačně nabitými tenzidy. Tetradecylsulfát sodný a dodecylsulfát sodný byly použity jakožto zástupci anionaktivních tenzidů. Hlavní výhodou tetradecylsulfátu sodného je jeho plná biokompatibilita a již existující uplatnění v medicínských aplikacích. Používá se při léčbě křečových žil, kde vystupuje jako aktivní složka léku Soltradecol. Dodecylsulfát sodný nachází uplatnění především v kosmetice.

Práce se tedy zaměřuje na problematiku přípravy gelů z výše zmíněných polymerů a tenzidů, zkoumá především vliv metody přípravy, vliv koncentrace či vliv iontové síly a pH. Především problematika přípravy gelů z *N,N,N*-trimethylchitosanu a anionaktivních tenzidů je doposud nepříliš zkoumaná, a proto zde tkví hlavní přínos této práce. Stěžejní metodou práce je reologie, která nám umožňuje blíže charakterizovat mechanické vlastnosti připravených hydrogelů a stanovit tak ideální metodu přípravy.

2 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem předložené závěrečné práce byla příprava hydrogelů na bázi kationaktivního polyelektrolytu a anionaktivního tenzidu a následné studium vlastností, především vlastností mechanických, připravených hydrogelů. Prvním krokem bylo vypracování rešerše na téma přípravy a charakterizace výše specifikovaných hydrogelů. Na základě této rešerše byly vybrány dvojice polyelektrolyt/síťovací činidlo. Jakožto zástupce kationaktivního polyelektrolytu byl vybrán chitosan, případně *N,N,N*-trimethylchitosan, jehož syntéza je součástí této práce. Tetradecylsulfát sodný a dodecylsulfát sodný byli vybráni jakožto zástupci anionaktivních tenzidů. Nedílnou součástí práce byl také výběr vhodného chitosanu pro syntézu *N,N,N*-trimethylchitosanu a následná charakterizace produktu syntézy pomocí SEC-MALS, elementární analýzy, infračervené spektroskopie a nukleární magnetické rezonance. Poté bylo přistoupeno k hlavnímu cíli této diplomové práce, a to přípravě a charakterizaci polyelektrolytových gelů. Na základě rešerše byla jako vhodná metoda pro charakterizaci a prokázání interakcí vybrána reologie. Co se týče přípravy hydrogelů, byly v experimentální části vyzkoušeny čtyři metody přípravy (mokrý cesta stání, mokrý cesta odstředění, suchá cesta stání a suchá cesta odstředění) a z nich byla zvolena optimální metoda přípravy. Rozdíly v metodách byly rovněž zkoumány reologicky za pomoci jednoduchých oscilačních testů. Posledním bodem, kterého mělo být v této práci dosaženo, je diskuze vlivu základních fyzikálně-chemických parametrů na finální vlastnosti hydrogelů. Z těchto parametrů byl zkoumán vliv pH a iontové síly na připravené hydrogely, a to jak senzoricky, tak reologicky. V závěru předložené práce jsou diskutovány naměřené výsledky a zhodnoceny potenciální aplikace v oblasti medicínských aplikací.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Polyelektrolyty

Polyelektrolyt je vysokomolekulární látka, jež ve své struktuře obsahuje funkční skupiny schopné elektrolytické disociace v závislosti na charakteru prostředí, kterému jsou vystaveny [1]. Prostřednictvím disociace vznikají **makroionty** a **protiionty**. Makroionty se vyznačují velkým množstvím elementárních nábojů, protiionty mají příslušný počet malých iontů opačného náboje. Makromolekuly, přítomné v roztocích, tedy nesou elektrický náboj vzniklý disociací. Polyelektrolyty můžeme rozdělit na: *silné*, které disociují zcela (poly(diallyldimethylamonium chlorid)), a *slabé*, jež disociují pouze částečně ($-\text{COO}^-$). Podle povahy skupin schopných disociace můžeme polyelektrolyty rozdělit následovně:

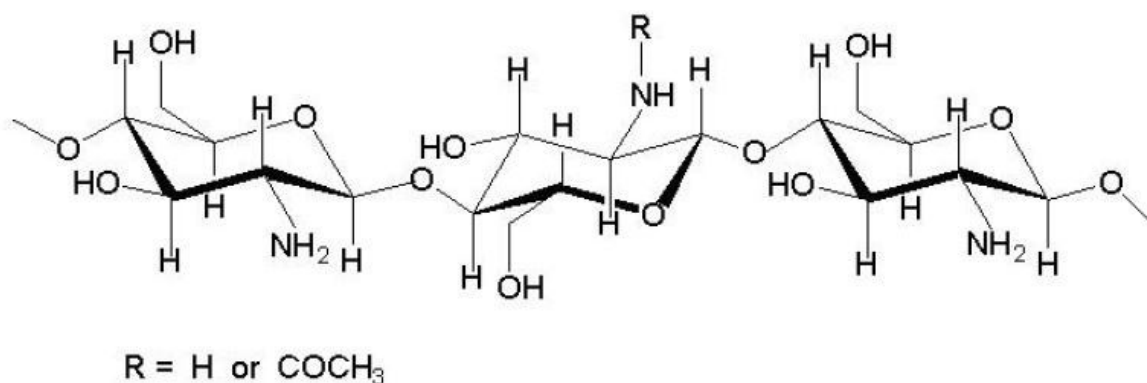
- Polyelektrolyty obsahující kyselé skupiny ($-\text{COO}^-$)
- Polyelektrolyty obsahující pouze zásadité skupiny ($-\text{NH}_3^+$)
- Amfoterní polyelektrolyty obsahující jak kyselé, tak zásadité skupiny (bílkoviny) [1].

Vlastnosti polyelektrolytů jsou ovlivněny především stupněm interakce mezi polymery. Jejich hlavní nevýhodou je možnost ovlivnění více faktory, než je tomu u ostatních sítí (koncentrace polyelektrolytu, polarita rozpouštědla, parametry iontu, atd.) [2]. Mezi typické polyelektrolyty patří například: chondroitin sulfát, hyaluronan, DNA, alginát, pektin, chitosan či syntetické polymery (polystyrensulfonát sodný).

3.2 Chitosan

3.2.1 Historie a struktura chitosanu

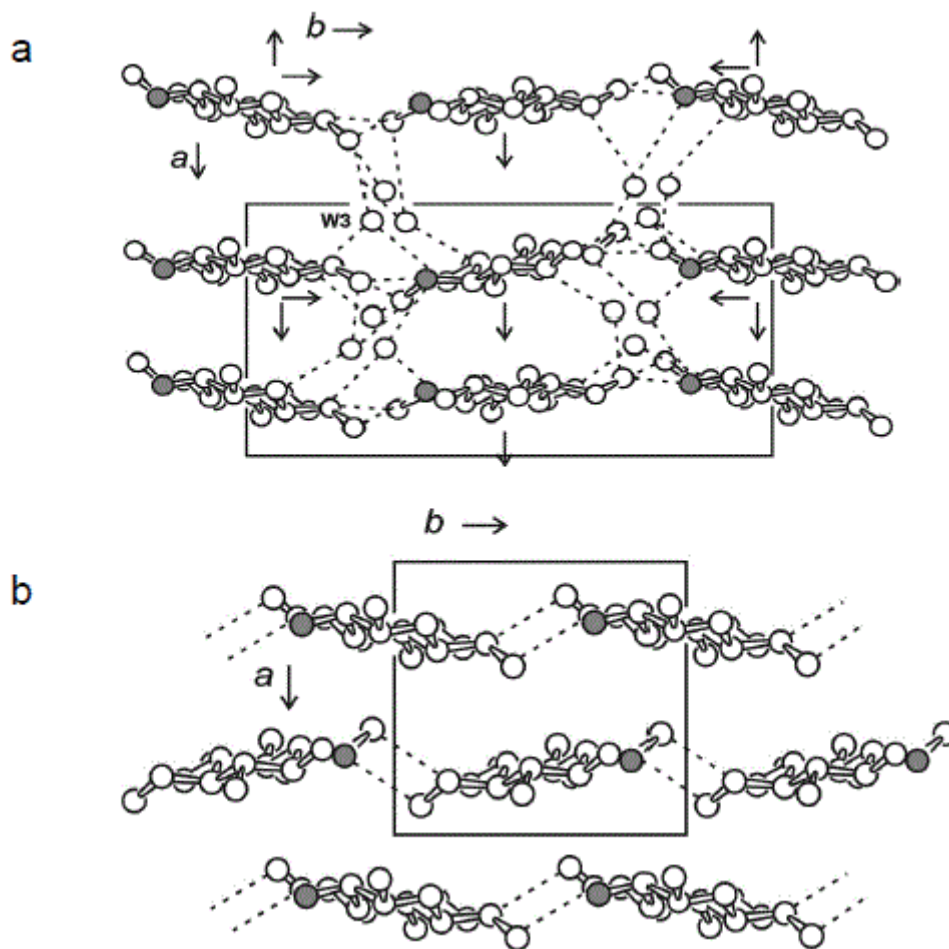
Chitosan se řadí mezi přírodní polymery typu polysacharidů, je nejvýznamnějším derivátem chitinu a vzniká jeho deacetylací. Strukturně se jedná o β -(1,4)-*D*-glukosamin, který je složený ze dvou podjednotek, a to: 2-acetamido-2-deoxy-*D*-glukopyranóza neboli *N*-acetylglukosamin a 2-amido-2-deoxy-*D*-glukopyranóza neboli glukosamin. Tyto podjednotky jsou spojeny β -(1,4) vazbou, která dává vznik tomuto kopolymeru, viz obrázek 1. Jeho výjimečnou vlastností je přítomnost kyselé funkční skupiny, díky níž je schopen se protonizovat a v kyselých roztocích vystupuje jako polykation. Podíl glukosaminových jednotek k celkovému počtu jednotek (glukosaminových a *N*-acetylglukosaminových skupin) udává hodnota F_A nazývaná jako stupeň acetylce (DA), případně stupeň deacetylce (DD). 100 % acetylovaný chitin či 100 % deacetylovaný chitosan se v přírodě nevyskytují. Obvyklé zastoupení *N*-acetylglukosaminových jednotek v přírodě je 70 – 90 %, z čehož vyplývá, že v přírodě převládá chitin [3]. Což také potvrzuje fakt, že chitin je druhým nejrozšířenějším polysacharidem po celulóze.



Obrázek 1: *Struktura chitosanu* [4]

Chitin byl poprvé pozorován a identifikován francouzským vědcem Henri Braconnotem v roce 1811, kdežto chitosan byl objeven až roku 1859 Charlesem Rougeutem a následně pojmenován Hoppe-Seylerem v roce 1894 [5]. Struktura chitosanu byla objevena roku 1950 vědci Darmonem a Rudallem pomocí rentgenové difrakce, infračervené spektroskopie (IČ) a enzymatické analýzy. Pro své výjimečné vlastnosti je chitosan a jeho deriváty stále předmětem mnoha výzkumů [5].

Rentgenostrukturní analýzou byly objeveny čtyři krystalické polymorfy chitosanu, tři hydratované (tendonová forma, forma II a LII), které snadno vytvářejí ve vodě rozpustné soli s organickými a minerálními kyselinami a jedna nehydratovaná forma, která vzniká zahříváním hydratovaného chitosanu na teplotu 200 °C. Dehydratací se zkracují vzdálenosti vrcholů struktury a oddálení jednotlivých řetězců, což je znázorněno na obrázku 2. Tato změna je ireverzibilní. Nehydratované krystaly jsou nerozpustné v kyselinách, netvoří komplexy s kovovými ionty a ztrácí tak funkce biomateriálů, mohou však být využity jako inertní pryskyřice [6].



Obrázek 2: a) Hydratovaný chitosan, b) Nehydratovaný chitosan [6]

Molekula chitosanu má tři aktivní centra: primární aminoskupinu, primární a sekundární hydroxyskupinu. Aminoskupina snadno podléhá kvarternizaci, čímž lze zvýšit rozpustnost chitosanu ve vodě a tvoří komplexy s ionty kovů. Primární hydroxyskupina bývá nejčastěji substituována spojovacími články, na které se váže aktivní složka – léčivo nebo skupina, která je zodpovědná za cílení léčiva nebo zvýšení rozpustnosti ve vodě. Sekundární hydroxyskupina je modifikována především za účelem zvýšení rozpustnosti ve vodě [6]. Porovnáme-li chitosan s chitinem, má chitosan větší chemickou i biochemickou aktivitu, což je způsobeno přítomností volné aminoskupiny.

3.2.2 Vlastnosti chitosanu

Přítomnost volné aminoskupiny zapříčiňuje unikátní vlastnosti chitosanu. Chitosan je jediným kationickým polysacharidem přírodního charakteru. Díky volné aminoskupině je chitosan schopen tvořit komplexy s ionty kovů a chovat se ve vodných roztocích jako polykationt. Kationická povaha také způsobuje to, že interaguje nespecificky s buňkami a tím se stává velmi dobrou kultivační matricí pro celou řadu buněk [7]. Chitosan je také mukoadhesivní látkou, což znamená, že je schopen přenosu léčiva přes mukózní membránu sliznice do krve. Jako jediný polysacharid je štěpen proteolytickými enzymy, což se využívá při přípravě oligosacharidů. Vykazuje také antibakteriální účinnost vůči mnoha gram pozitivním bakteriím

(*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis*) i gramnegativním bakteriím (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*) a houbám při $\text{pH} < 6$ [6]. Mezi další výhodné vlastnosti chitosanu patří jeho biokompatibilita a biodegradabilita.

Právě tyto vlastnosti způsobují obrovský nárůst výzkumů a publikací zabývajících se chitosanem. Autoři Franco a Peter shrnují v referenci [8] pokroky ve výzkumu chitinu a chitosanu. Výrobou a vlastnostmi biokompozitních filmů z chitosanu a celulózy se zabývá reference [9]. Struktura a funkce chitináz jsou zkoumány referencí [10]. Polyelektrolytové komplexy chitosanu s dalšími makromolekulami byly předmětem studia reference [11], a to z důvodu jejich potenciálu pro farmaceutické a potravinářské využití. Jakožto účinné katalyzátory pro výrobu bionafty transesterifikací sójového oleje s methanolem se projevíly v referenci [12] kompozity chitosanu a oxidu vápenatého.

Chitosan je rozpustný ve zředěných kyselinách (octová, mravenčí či minerální kyseliny) a ve směsi dimethylformamidu/ N_2O_4 . Nerozpustný je ve vodě a ve většině organických rozpouštědel.

3.2.3 Výskyt a výroba chitosanu

Průmyslově využívané zdroje chitosanu nalezneme u živočichů, rostlin a mikroorganismů. Ze živočišných zdrojů se jedná především o krunýře krabů, krevet nebo chrupavčitou strunu hlavonožců, která poskytuje chitosan s nejvyšší molekulovou hmotností. U rostlinných zdrojů jsou to především vyšší houby, jakožto hlíva ústříčná či žampiony. Chitosan se také vyskytuje jako součást buněčné stěny plísní rodu *Aspergillus* a *Mucor* [6].

Chitosan získáváme z chitinu. Chitin je, stejně jako celulóza, hojně zastoupený v biosféře a dostupný z obnovitelných zdrojů. Roční regenerace chitinu je dokonce vyšší než u celulózy. Hlavním zdrojem pro výrobu chitinu je odpad ze zpracování krevet a jiných korýšů, což se odhaduje na 106 tun za rok [13] s obsahem chitinu v sušině mezi 10 až 30 %. Průmyslová poptávka po chitinu byla však v roce 2000 odhadnuta pouze na 10 000 tun ročně [13]. Většina chitinu se hydrolyzuje za účelem výroby glukosaminů. Poptávka po chitosanu, se odhaduje na 2000 tun ročně [13].

Chitosan se získává alkalickou deacetylací chitinu, několikahodinovým varem s 50% hydroxidem sodným či enzymaticky působením *N*-deacetylasy. Alkalická deacetylase spočívá v odstranění bílkovin a rozpuštění uhličitanu vápenatého, který je přítomen v krunýřích krabů ve vysokých koncentracích. Chitin je následně deacetylován ve 40% roztoku hydroxidu sodného při teplotě 120 °C po dobu 1–3 hodin. Výsledkem je chitosan se 70% stupněm deacetylce [14].

Co se týče ekonomických aspektů na výrobu 1 kg 70 % deacetylovaného chitosanu z ulit korýšů je potřeba 6,3 kg kyseliny chlorovodíkové a 1,8 kg hydroxidu sodného, dále také dusík, 500 kg technologické vody a 900 kg chladicí vody. Chitin a chitosan se nyní komerčně vyrábějí v Indii, Japonsku, Polsku, Norsku a Austrálii [14]. Nevyužitými zdroji korýšů disponuje například Norsko, Mexiko nebo Chile.

Reference [15] poskytuje srovnání výroby chitosanu alkalickou deacetylací a fermentací. Tradiční postup výroby chitosanu zahrnuje použití silné kyseliny chlorovodíkové za účelem deacetylace chitinu. Studie však ukazuje také použití smíšené kultury bakterií produkujících kyselinu mléčnou (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus lactis*), jejichž fermentace v odpadu ze zpracování krevet vede k deacetylaci chitinu na chitosan. Chitosan byl v této studii připravován dvěma způsoby: odpad z krevet byl fermentován s bakteriemi produkujícími kyselinu mléčnou při teplotě 30 °C po dobu 5 dní nebo působením 1 M kyseliny mléčné při laboratorní teplotě po dobu 2 h. Hlavní výhoda této metody spočívá v nahrazení silných chemikálií, jakožto kyselina chlorovodíková nebo hydroxid sodný, se kterými nejenže je nebezpečné pracovat, ale také představují potenciální nebezpečí pro životní prostředí. Chitosan produkovaný jak fermentací, tak působením kyseliny mléčné měl shodné vlastnosti s chitosanem vyráběným použitím kyseliny chlorovodíkové.

3.2.4 Využití chitosanu

Chitosan představuje díky svým unikátním vlastnostem obrovský potenciál ve využití napříč mnoha odvětvími. V této kapitole jsou přiblížena některá odvětví.

Biomedicínské a farmaceutické aplikace

Ucelený přehled aplikací chitosanu ve farmaceutickém průmyslu poskytuje reference [16]. Hlavními důvody pro využití chitosanu v biomedicínských a farmaceutických aplikacích je jeho biodegradabilita, biokompatibilita a antibakteriální vlastnosti. Mechanismus antibakteriální činnosti není přesně znám, avšak předpokládá se, že je založen na interakcích kladně nabitých aminoskupin s negativně nabitými komponentami mikrobiálních buněčných membrán, tím mění propustnost a způsobují únik intracelulárního obsahu, což vede k rozpadu buněk [17].

Jednou z možností využití chitosanu je jeho využití jakožto nosiče léčiv. Jako nosič léčiv se může vyskytovat ve formě hydrogelu, tablet nebo mikrokapsulí. Mikrokapsule jsou duté kulaté částice o velikosti 50 nm až 2 mm [16]. Přípravou a charakterizací chitosan-alginátových mikrokapsulí, které by mohly nacházet uplatnění jakožto nosiče léčiv s kontrolovaným uvolňováním, se zabývá reference [18]. Hlavní výhodou hydrogelové formy je závislost jejího nabotnutí na pH, čehož se využívá především pro cílený transport.

Další vlastností chitosanu, která jej předurčuje pro využití v tomto odvětví je jeho protinádorová aktivita. Protinádorová aktivita chitosanu závisí na jeho molekulové hmotnosti, rozpustnosti a obsahu acetylových skupin. Vysokomolekulární chitosan je neúčinný. Reference [19] zkoumala na buněčné linii 293 a HeLa linii (buněčná linie lidských epitelových buněk) různé poměry chitosanu a pentahydrátu síranu měďnatého, ukázalo se, že účinnost závisí na koncentraci iontů v komplexu. Měďnatý komplex interaguje s DNA, což způsobí rozštěpení DNA a protinádorovou účinnost.

Úpravou chitosanu na *O*-karboxymethylovaný chitosan je také možno jej využít k zástavě krvácení. I zde je využito kladného náboje chitosanu, který interaguje se záporně nabitými červenými krvinkami [16].

Další výhodnou vlastností chitosanu je schopnost inhibovat tvorbu fibroblastů, jež se podílejí na tvorbě jizev, a tím umožňuje regeneraci tkáně. Chitosan může podporovat hojení tkáně dvěma způsoby, buď stimulací tvorby granulační tkáně nebo opětovnou tvorbou epitelové tkáně (reepitelizací). Můžeme jej tedy využít při výrobě obvazů či chirurgických nití. Reference [20] popisuje postup přípravy mikroporózního chitosanového hydrogelu určeného pro regeneraci kožní tkáně.

Chitosan též nachází svoje uplatnění při výrobě tzv. *scaffoldů*, jež slouží jako matrice pro růst nových buněk, tkání či dokonce orgánů. Zde používáme porézní chitosanové hydrogely. Reference [21] porovnává chitosanové *scaffoldy* vyráběné elektrostatickým zvláknováním a lyofilizací.

Biokompatibilita, dobré optické vlastnosti, mechanická stabilita, propustnost pro plyny a smáčivost jsou klíčové vlastnosti umožňující využití nízkomolekulárního chitosanu při výrobě kontaktních čoček, viz reference [22].

Kosmetika

Chitosan můžeme nalézt v krémech, čistících emulzích, lacích na nehty či balzámech na rty. V kosmetice je hojně používán především díky jeho kladnému náboji, relativně vyšší molekulové hmotnosti, která znemožňuje jeho penetraci do pokožky. Další předností chitosanu jsou jeho hydratační schopnosti a nižší cena (oproti kyselině hyaluronové). V opalovacích krémech je opět využíváno přítomnosti aminoskupiny, jejímž prostřednictvím lze molekulu chitosanu spojit s látkami absorbujícími ultrafialové záření. V prostředcích na vlasy dosahujeme pomocí chitosanu jejich vyšší mechanické pevnosti, hebkosti, jemnosti a také působí antielektrostatickým efektem. Jeho antibakteriálního a fungicidního efektu využíváme v zubních pastách [23].

Potravinářství

Přijímáním chitosanu s potravou dochází ke snížení vstřebávání tuků, jelikož chitosan dokáže vázat několikanásobně více tuků než je jeho hmotnost, dále také snižuje pocit hladu a zlepšuje činnost tlustého střeva [6]. Takovéto doplňky jsou určeny k redukci hmotnosti. Díky antimikrobiální aktivitě lze pomocí roztoků chitosanu ošetřit některé produkty, čímž můžeme výrazně prodloužit trvanlivost takovýchto výrobků.

Ochrana životního prostředí

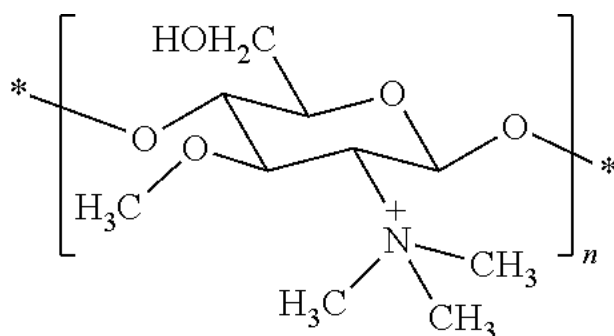
Při úpravách vody se využívá především jeho afinity k těžkým kovům a sorpčních vlastností za účelem odstranění velkého množství látek z odpadních vod. K čemuž je využíváno značné množství světové produkce chitosanu. Sorpční vlastnosti chitosanu jsou silně závislé na hodnotě pH [14].

3.2.5 *N,N,N* - trimethylchitosan

Obrovskou limitací při využití nemodifikovaného chitosanu je fakt, že není rozpustný v roztoku s pH 5,6 a vyšším [24]. Hodnota pH tenkého střeva, ve kterém dochází ke vstřebávání většiny léčiv podaných prostřednictvím dutiny ústní (*per os*), se pohybuje mezi

7 až 9. V této souvislosti se jeví potřeba derivátů chitosanu, které by byly rozpustné v neutrálním či zásaditém prostředí.

Jak již bylo zmíněno výše, jedním ze tří reaktivních center molekuly chitosanu je primární aminoskupina, která snadno podléhá kvarternizaci. Kvarternizace dusíku aminoskupiny patří k nejčastějším modifikacím. Pomocí kvarternizace lze zvýšit rozpustnost chitosanu ve vodě a podpořit tvorbu komplexů s ionty kovů, chitosan si však stále ponechá svůj kladný náboj. Chitosan disponuje kladným nábojem jako jediný z polysacharidů, čímž se stává unikátním. Methylace chitosanu poté vede ke vzniku *N,N,N* - trimethylchitosanu (TMC), jehož struktura je znázorněna na obrázku 3.



Obrázek 3: *N,N,N* - trimethylchitosan [25]

Náboj kvarterní amoniové skupiny chitosanu umožňuje jeho rozpustnost v dolních částech gastrointestinálního traktu za neutrálních nebo alkalických podmínek [26] a také větší antimikrobiální aktivitu [6], což je způsobeno nárůstem kladného náboje. Nemethylovaný chitosan svoji antimikrobiální aktivitu v neutrálních a alkalických roztocích ztrácí. Nejvyšší rozpustnost byla zjištěna u TMC se středním stupněm kvarternizace (40 %) bez ohledu na stupeň deacetylce použitého chitosanu [27].

Vlastnosti TMC zkoumal v referenci [28] Kotzé a kol., jeho skupina se zabývala především zlepšeným permeačním účinkem. Studie prokázaly, že TMC zvýšil transport malých hydrofilních sloučenin, jako jsou například [^{14}C] - mannitol, velkých molekul jako je [^{14}C] PEG4000 a léčiv na bázi peptidů, mezi které patří busserelin či oktreotid, přes buněčné membrány.

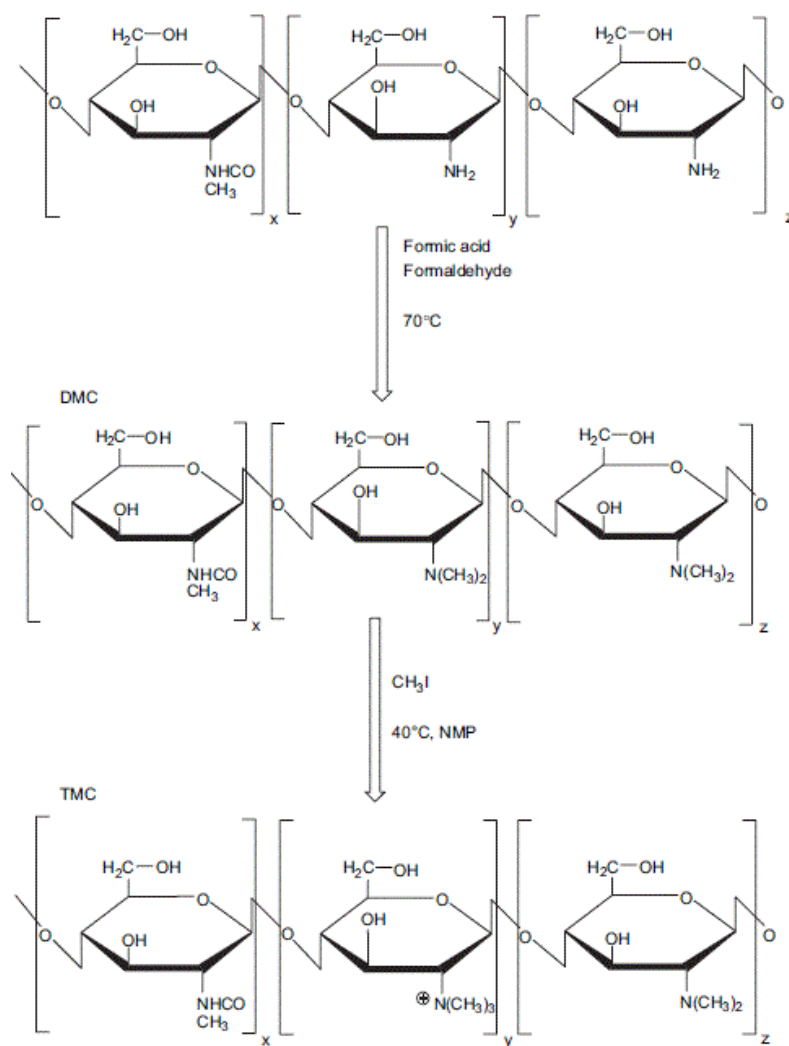
Stupeň kvarternizace TMC (DQ, z angl. *Degree of Quaternization*), neboli hustota náboje, určuje počet kladných nábojů, které jsou v molekule k dispozici pro interakce s negativně nabitými místy epitelové membrány, a tím ovlivňuje vlastnosti zvyšující absorpci léčiv. U TMC se stupněm kvarternizace 60 % bylo prokázáno, že účinně zvyšuje jak nosní, tak rektální absorpci inzulinu u potkanů, a to zejména při neutrálních hodnotách pH, kdy TMC s hodnotou DQ 12,3 % a taktéž nemodifikovaný chitosan byly neúčinné [24]. Na základě tohoto výzkumu se nabízí využití nanočástic z TMC pro transport inzulinu podaného *per os* [29]. Reference [30] popisuje využití mikročástic TMC jako nosič pro transport inhalačně podávaného inzulinu. Dalším využitím mohou být například

superporózní hydrogelové systémy obsahující TMC, které zvyšují absorpci léčiva desmopresin přes střevní buňky [31].

Mezi hlavní negativa TMC patří jeho vysoká cena a špatná dostupnost (nutnost syntézy), což stále omezuje aplikace TMC [24]. Přehled metod syntézy *N,N,N*-trimethylchitosanu poskytuje reference [24]. V této práci byla použita metoda syntézy autorů Verhela a kol. [32]. Autoři zde popisují syntézu TMC s částečnou kvarternizací, tedy bez methylace hydroxyskupiny. A to na základě předchozích zjištění, že *O*-methylace společně s variacemi v délce polymerního řetězce mohou mít vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti produktu, mezi které patří rozpustnost ve vodě, schopnost absorpce, a pravděpodobně též i na biologické vlastnosti TMC, což je například vliv na otevírání těsných spojů mezi bunčkami (z angl. *tight junctions*) či toxicita. *Tight junctions* se vyskytují především ve střevech a hrají velkou roli při vstřebávání látek, což je striktně regulovaný děj. Další nevýhodou *O*-methylace je též možnost štěpení řetězce [32].

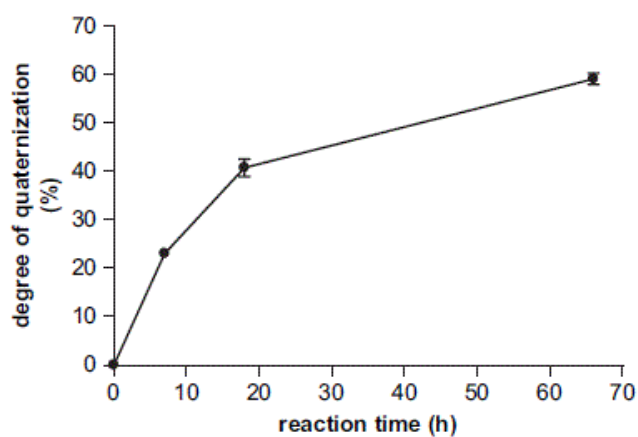
Autoři [32] popisují jak syntézu TMC bez *O*-methylace, tak *O*-methylovaného TMC. Při obou syntézách byl použit chitosan s 93 % stupněm deacetylce a molekulovou hmotností 42 kDa. Syntéza TMC bez *O*-methylace byla dvoukroková. Chitosan byl v prvním kroku, viz obrázek 4, převeden na *N,N*-dimethylchitosan (DMC) prostřednictvím Eschweiler–Clarekeovy reakce za použití formaldehydu (37 % formaldehyd stabilizovaný methanolem) a kyseliny mravenčí. DMC byl následně podroben analýze metodou nukleární magnetické rezonance (NMR). Z výsledků analýzy bylo patrné, že produkt měl hodnotu stupně dimethylace 93 %, jelikož byl použit chitosan s 93 % stupněm deacetylce, můžeme usuzovat, že všechny volné aminoskupiny byly dimethylovány. Ve druhém kroku byl DMC rozpuštěný v *N*-methyl-2-pyrrolidonu (NMP) převeden na TMC použitím nadbytku methylenjodidu.

Z výsledků studie je patrné, že oba typy TMC (bez i s *O*-methylací) a stupněm kvarternizace vyšším než 24 % byly rozpustné ve vodném roztoku o hodnotě pH 7, zatímco chitosan a taktéž DMC rozpustné nebyly. Studie také srovnávaly vliv transepitelární elektrické rezistence (TEER), kde použití TMC bez *O*-methylace vedlo k daleko většímu poklesu hodnoty TEER než u *O*-methylovaného TMC. Navíc TMC bez *O*-methylace odpovídá ve větší míře původní struktuře chitosanu.



Obrázek 4: Syntéza TMC bez O - methylace [32]

Obrázek 5 ukazuje, že stupeň kvarternizace je přímo závislý na reakční době za splněního předpokladu udržování reakční teploty a konstantního poměru DMC / CH₃I.



Obrázek 5: Závislost stupně kvarternizace na reakční době [32]

3.3 Tenzidy

Interakce mezi polymery a tenzidy jsou v posledních letech předmětem řady studií. Tyto komplexy bývají často základem mnoha komerčních produktů, používaných v potravinářství, medicíně, farmacii či při výrobě detergentů. Do popředí zájmu se dostávají zejména systémy na bázi nabitého polymeru a opačně nabitě povrchově aktivní látky, kde se předpokládá interakce na bázi elektrostatických sil. Vzhledem k biokompatibilitě chitosanu mohou výsledné komplexy sloužit jako bezpečné složky pro stabilizaci kosmetických přípravků i jako nosiče léčiv s kontrolovaným uvolňováním.

Tenzid, neboli též povrchově aktivní látka (PAL), je organická látka, která je schopna se hromadit již při nízké koncentraci na fázovém rozhraní, a tím snižovat mezifázovou energii soustavy [33]. Tenzidy jsou často nesprávně zaměňovány s detergenty: detergent je směs tenzidů a dalších látek, která má detergenční vlastnosti. Detergence je schopnost převádět nečistotu z pevného povrchu do objemové fáze roztoku [33].

Tenzidy disponují amfifilní strukturou, která je charakterizována přítomností polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) části. Nepolární část molekuly je obvykle tvořena dlouhým uhlovodíkovým řetězcem, kdežto polární část je tvořena výrazně polární skupinou (např.: $-\text{COOH}$, $-\text{SO}_3\text{H}$ atd.). Za účelem lepší rozpustnosti tenzidů ve vodě jsou využívány sodné či draselné soli vzniklé substitucí atomu vodíku v polárních skupinách atomy sodíku či draslíku (např.: $-\text{COONa}$, SO_3K) [34].

Nejčastěji používané dělení tenzidů podle jejich schopnosti disociovat ve vodném prostředí je uvedeno níže, viz obrázek 6:

Ionogenní

Je-li micelární koloid ionogenní, polární skupiny disociují a uvolňují protiiony. Micela se z tohoto hlediska chová jako globulární polyelektrolyt. Část protiiontu je vázána těsně u povrchu micely a zbytek vytváří kolem micely difúzní iontovou atmosféru, jejíž dosah lze zkrátit zvýšením iontové síly vodného prostředí.

Aniontové – disociují za vzniku povrchově aktivních iontů. Hlavní zastoupení zde mají alkalické soli vyšších mastných kyselin. Nejstarším a nejdéle používaným anionickým tenzidem je mýdlo, tedy sodná sůl vyšších karboxylových kyselin ($\text{C}_{10}\text{--}\text{C}_{22}$). Rozpustnost ve vodě zajišťuje funkční skupina COO^- . Nejrozšířenějším anionickým tenzidem je poměrně dobře biologicky rozložitelný lineární natrium-sek-alkylbenzensulfonát, který se využívá jako základ pro práškové prací prostředky, kapalné mycí a prací prostředky [33]. Mezi další aniontové tenzidy se řadí parafínsulfonáty, methylestersulfonáty, natrium-alkylsulfáty či v této práci použitý dodecylsulfát sodný (SDS) či tetradecylsulfát sodný (STS).

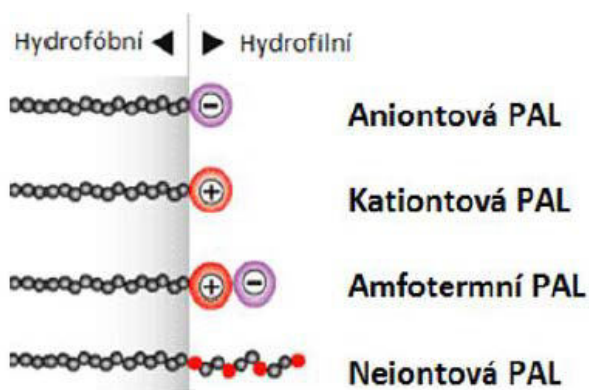
Kationtové – disociují za vzniku povrchově aktivních kationtů. Téměř u všech kationických tenzidů je kationtem kvartérní dusíkový atom, jedná se tedy o kvartérní amoniové soli, a to chloridy nebo methosulfáty. Kvartérní amoniové soli mají většinou jeden až tři delší alkyly. Nacházejí využití v avivážích či kondicionérech. Jejich biologická rozložitelnost je oproti anionickým tenzidům obecně horší a také je s nimi nelze kombinovat, jelikož

by docházelo ke vzniku nerozpustného aglomerátu [33]. Mezi hlavní představitele patří cetyltrimetylamoniumbromid nebo cetylpyridiniumchlorid.

Amfotermní – molekula obsahuje ve své struktuře bazickou i kyselou funkční skupinu, náboj micely tedy v tomto případě závisí na pH. Jejich hlavní výhodou je možnost kombinovat je v recepturách s kationickými i anionickými tensidy. Amfotermní tensidy nacházejí široké možnosti uplatnění v kosmetice jako součást šamponů, tekutých mýdel, koupelnových pěn. Příkladem této skupiny tensidů je alkylnpolyglykolsulfát, betain či lecithin.

Neionogenní

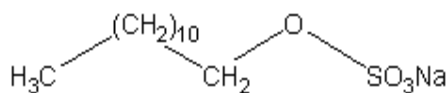
Nejsou schopné elektrolytické disociace. Jejich struktura je obvykle složena z dlouhého uhlovodíkového řetězce s několika polárními, ale neionogenními skupinami na konci (hydroxylové, esterové skupiny), jimiž je zajištěna rozpustnost těchto sloučenin [1]. Jako příklad může být uveden dodecylether tetraethylenglykolu. Mezi nejperspektivnější se v současné době řadí alkylnpolyglykosidy, jelikož pochází z obnovitelných rostlinných surovin. Uplatňují se v mycích, čistících a kosmetických prostředcích. Současně se začínají aplikovat v práškových detergentech [33].



Obrázek 6: Klasifikace tensidů [35]

3.3.1 Dodecylsulfát sodný (SDS)

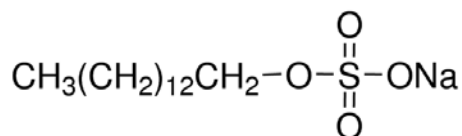
Dodecylsulfát sodný je typickým představitelem tensidů aniontové povahy, jeho strukturní vzorec je znázorněn na obrázku 7. Jedná se o sodnou sůl organosulfátu, přičemž tento organosulfát má 12 uhlíků a je připojen k záporně nabitě sulfátové skupině, která představuje aniontovou „hlavu“. Jeho amfifilní vlastnosti umožňují tvorbu micel v roztocích, což předurčuje jeho využití jako detergent. Nachází také využití jako součástí mnohých čistících a kosmetických prostředků, farmaceutických a potravinářských výrobků, kde ho můžeme bezpečně použít do koncentrace 1 hm. % [36]. U citlivějších jedinců může delší vystavení SDS o koncentraci vyšší než 1 hm. % vyvolávat vyrážku. Nemá však rakovinotvorné účinky (při aplikaci na kůži, ale ani při konzumaci) a oproti starším studiím se zdá, že nemá vliv ani na vznik ústních aftů. Dodecylsulfát sodný můžeme také využít v oblasti analytické chemie, a to při SDS–PAGE elektroforéze, kde slouží k denaturaci proteinu a udělení záporného náboje proteinům.



Obrázek 7: *Dodecylsulfát sodný* [36]

3.3.2 Tetradecylsulfát sodný (STS)

Tetradecylsulfát sodný je dalším zástupcem anionaktivních tenzidů. Jedná se o bílou, voskovitou hmotu. STS se může vyskytovat v lineární nebo větvené formě, větvená forma je známá pod komerčním názvem Niaproof. Hlavní výhodou STS je jeho úplná biokompatibilita. Používá se při léčbě křečových žil, kde vystupuje jako aktivní složka léku Soltradecol. Působí zde jako detergent na molekuly lipidů v buňkách žilní stěny [37].

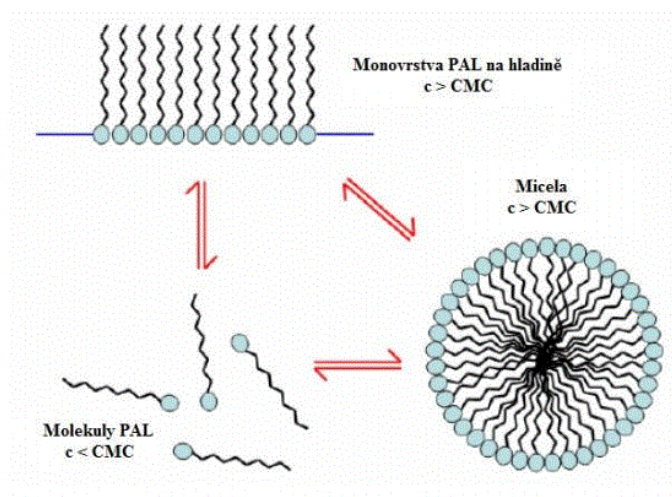


Obrázek 8: *Tetradecylsulfát sodný* [37]

3.3.3 Tvorba micel

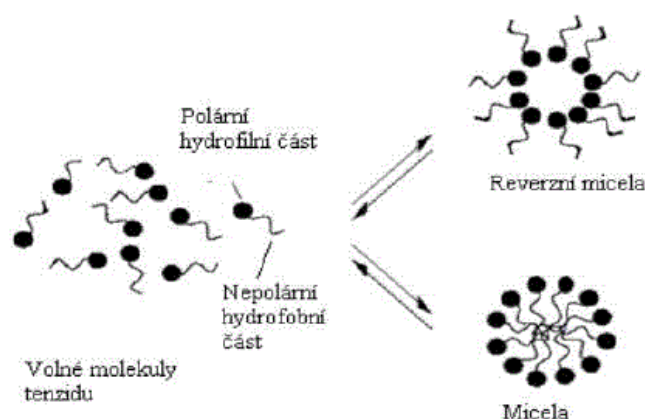
Tenzidy představují aplikačně nejvýznamnější skupinu PAL, zejména díky jejich schopnosti samovolně agregovat ve vodném roztoku do útvarů koloidní velikosti, zvaných micely. Ty vznikají od určité koncentrace PAL v roztoku, tzv. **kritické micelární koncentrace (CMC)** [38]. Tvorba micel je podmíněna tím, že molekula musí mít amfipatický neboli amfifilní charakter, což znamená, že se musí skládat z lyofilní části (část rozpustná v daném prostředí) a lyofobní části (část nerozpustná v daném prostředí), jejíž neochota ke kontaktům s molekulami rozpouštědla je pak příčinou asociace.

Ve velmi zředěných roztocích se tenzidy chovají jako pravé roztoky. Zvýšením koncentrace se začínají vyskytovat v roztoku jako volné molekuly, ale také se shromažďovat na mezifázovém rozhraní, kde snižují povrchové napětí. Ve vodných roztocích se hydrofilní hlavy orientují dovnitř roztoku, zatímco hydrofobní alkylové řetězce dovnitř micely. Úplným nasycením povrchu kapaliny dosáhneme hodnoty CMC. Tento proces tvorby micel se nazývá micelalizace a znázorňuje jej obrázek 9 [39, 40].



Obrázek 9: Jednotlivé fáze PAL v závislosti na koncentraci roztoku [41]

V případě nepolárního prostředí opět může docházet ke tvorbě micel, které se však odlišují od klasických micel strukturou. Jejich jádro je tvořeno polární hydrofilní skupinou, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního hydrofobního roztoku. [42, 43]. Struktura reverzní micely je znázorněna níže, viz obrázek 10.



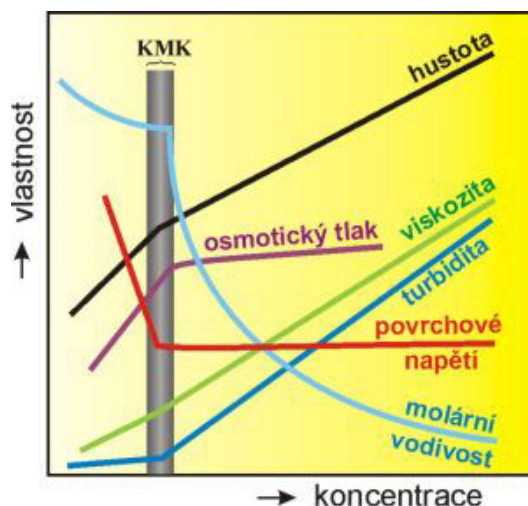
Obrázek 10: Struktura micely v závislosti na prostředí [42]

Rozpustnost mnoha organických PAL silně závisí na teplotě, pro dosažení CMC je tak nutné i dosažení dostatečně vysoké teploty, při níž rozpustnost dosahuje hodnoty CMC. Tato teplota se nazývá **Krafftova teplota** a je unikátní pro každý tenzid. Nad touto teplotou rozpustnost PAL prudce stoupá díky tvorbě micel v roztoku. Při teplotách nižších než je Krafftova teplota se micely netvoří [38].

Mezi hlavní micelární parametry patří velikost, tvar, struktura, náboj a agregační číslo. **Agregační číslo** udává počet molekul tenzidu, které tvoří jednu micelu. Tato hodnota roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy [43]. Další charakteristickou veličinou je **kritická agregační koncentrace (CAC)**. Přidáme-li do roztoku PAL vhodnou látku (polymer), může docházet k agregaci již při nižší koncentraci, než je hodnota CMC. Elektrostatickými a hydrofobními interakcemi interaguje tenzid s molekulami

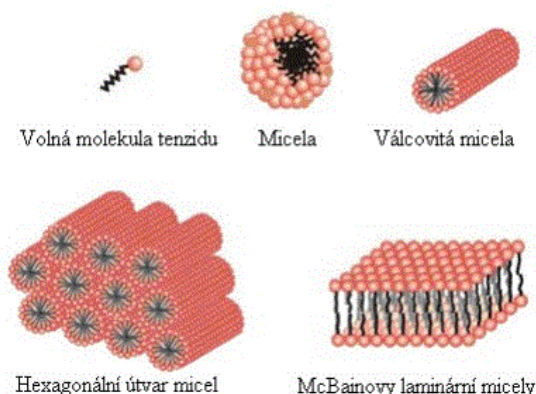
polymeru a dochází k vytvoření tzv. „*minimicel*“ tenzidu na povrchu polymeru. Hodnoty hlavních micelárních parametrů závisí na teplotě, tlaku, chemické struktuře molekul PAL a také na celkovém složení roztoku, ve kterém micely vznikly (pH, iontová síla, typ protiiontu) [44].

Reference [1] a graf na obrázku 11 popisují, jak se po dosažení hodnoty kritické micelární koncentrace (CMC) mění jednotlivé fyzikálně-chemické vlastnosti. Z grafu je patrné, že k největším změnám dochází po dosažení CMC u povrchového napětí, molární vodivosti a též osmotického tlaku.



Obrázek 11: Závislost vlastností roztoků PAL na koncentraci pro vodné roztoky SDS [1]

Jak již bylo řečeno, velikost a tvar micel jsou závislé především na koncentraci tenzidu, teplotě, pH a iontové síle roztoku. S rostoucí koncentrací PAL v roztoku se rozměr micel zvětšuje a mění se jejich tvar. Nejprve vznikají válcovité agregáty, které postupně přecházejí v hexagonální kapalně krystaly. Při vyšších koncentracích PAL vznikají dokonce útvary složené ze dvou vrstev PAL nazývané laminární McBainovy micely. Jejich struktura je, stejně jako struktura všech ostatních tvarů micel, znázorněna na obrázku 12. Díky charakteristickému uspořádání laminárních micel může docházet k přechodu roztoku v gel [42].



Obrázek 12: Tvary micel [42]

Jedinečné vlastnosti micelárních roztoků PAL jsou využívány prakticky ve všech odvětvích průmyslu včetně chemického výzkumu, taktéž v každodenním životě. Heterogenní systém, tvořený rozpouštědlem a micelami, resp. jejich nepolárním jádrem, umožňuje tzv. solubilizaci nepolárních látek ve vodném prostředí, ve kterém jsou jinak velmi špatně rozpustné [45]. V posledním období se objevují nové oblasti využití micelárních soustav: například jako nosiče léků nebo jako prostředí pro syntézu nanostrukturních látek [46]. Velký potenciál má především použití povrchově aktivních látek jako nosičů nepolárních léčiv pro nádorovou terapii. Micelární soustavy, představující mikroheterogenní systém se schopností separovat částice s různým stupněm polarizace, pronikly i do elektroanalytických metod a přinesly nové možnosti hlavně v oblasti separačních procesů využívaných v kapilární elektroforéze. Za přítomnosti micelárního systému tak lze analyzovat v elektrickém poli i látky bez elektrického náboje [38].

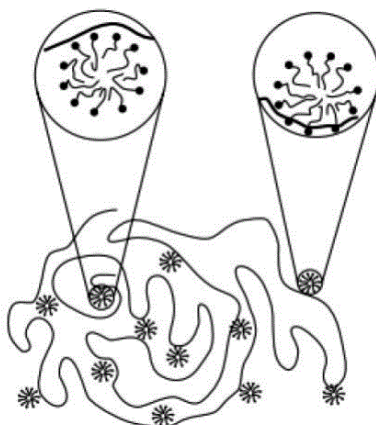
3.3.4 Solubilizace

Jak již bylo zmíněno výše, solubilizace je výjimečnou vlastností micelárních koloidů. Solubilizace je zapříčiněna jejich amfifilní povahou a představuje schopnost rozpustit látku v daném rozpouštědle nerozpustné. Existují různé mechanismy solubilizace, které závisí především na povaze solubilizované látky. Podmínkou solubilizace je koncentrace vyšší než CMC, z čehož vyplývá, že solubilizovaná látka je v koloidním roztoku začleněna do micely a není přítomna v disperzním prostředí. Nejčastějším typem solubilizace je rozpouštění nepolárních látek ve vodném prostředí, tyto nepolární látky se inkorporují do jádra micely. Uhlovodíkové řetězce polárně–nepolárních látek směřují dovnitř micel, zatímco polární skupiny ven z micely. K solubilizaci polárních látek dochází na povrchu micely. V případě laminárních micel způsobují rozpouštěné látky oddalování molekulových řetězců tenzidu, jelikož se inkorporují mezi uhlovodíkové konce molekul. Důsledkem solubilizace je nárůst hmotnosti micely, což je způsobeno nejen přítomností molekul rozpouštěné látky v jádře micely, ale také zvětšením objemu hydrofobního jádra [1, 38, 39].

3.3.5 Interakce polyelektrolyt–tenzid

V posledních letech zaznamenáváme velký nárůst studií zabývajících se problematikou interakcí polyelektrolytů s tenzidy, především z důvodu nárůstu využití těchto komplexů v komerčních produktech. Tyto interakce jsou závislé na povaze látek a liší se jak povahou, tak silou interakce. Nejslabší vazby, v některých případech dokonce k vytvoření vazby nedochází, vznikají mezi neiontovými tenzidy a nenabitými polymery. V případě interakce iontových tenzidů s neiontovým polymerem reagují ochotněji aniontové tenzidy, které byly využity v této práci [47]. Interakce mezi polyelektrolytem a tenzidem jsou dvojího typu, a to hydrofobní a elektrostatické. Hydrofobní interakce převládají u polymerů obsahujících hydrofobní část molekul. Naopak elektrostatické interakce se objevují u polyelektrolytů majících opačný náboj než tenzidy. Což je způsobeno tím, že polyelektrolyt v roztoku disociuje a jeho disociované funkční skupiny jsou obklopeny protionty. Elektrostatické interakce mají vliv na chemické složení, lineární hustotu, pozici náboje a dynamiku kostry polymeru [42]. Působením interakcí mezi polyelektrolyty a tenzidy vznikají klastry, které jsou podobné micelám a nazývají se „*minimicely*“. Tyto útvary jsou navázány na řetězci polymeru

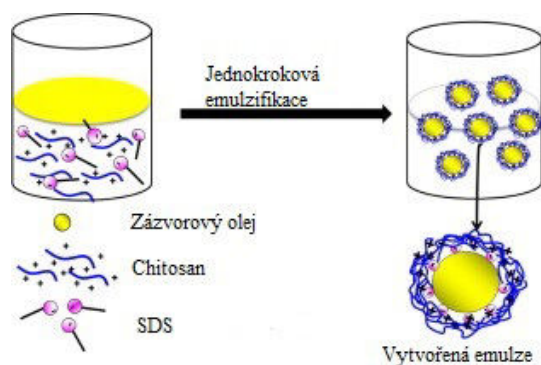
a svým charakteristickým tvarem, jež je znázorněn na obrázku 13, tato struktura připomíná perlový náhrdelník [42].



Obrázek 13: *Struktura perlového náhrdelníku* [42]

Tato práce se zabývá interakcemi chitosanu (CS) s anionaktivními tenzidy, a to konkrétně SDS a STS. Reference [48] popisuje nový typ chitosanových perel vytvořených gelací SDS. Tento typ hydrogelu se vyznačuje hustou membránou a mírně vyšší mechanickou pevností a odolností vůči kyselinám oproti chitosanovým gelům vyráběným alkalickou gelací bez přídavku SDS. Při alkalické gelaci dochází ke hlubokému proniknutí OH^- iontu do chitosanové perly, kdežto zde dochází ke tvorbě polyelektronového komplexu pouze na rozhraní vzhledem k velikosti molekuly povrchově aktivní látky a vytváří se tak gelová kapsle okolo chitosanové perly. Vytvořená síť je stabilizována kombinací elektrostatických, iontově-dipólových a hydrofobních interakcí. Bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací SDS vznikají rigidnější chitosanové perly. Nový typ perel vykazuje s narůstající koncentrací SDS při gelaci mnohem menší hmotnostní úbytek po aplikaci ultrazvuku než perly vyráběné alkalickou gelací, což naznačuje, že perly vyráběné SDS gelací jsou mechanicky odolnější. Perly vytvořené SDS gelací také prokazují mnohem větší adsorpční schopnost, a to zřejmě díky hydrofobním interakcím mezi SDS a použitým barvivem Kongo červení.

Reference [49] představuje možné využití emulzí chitosanu s SDS v medicíně či kosmetice. SDS molekuly interagují s kladně nabitými chitosanovými řetězci přitažlivými elektrostatickými silami za vzniku ve vodě nerozpustných komplexů. Přídavek SDS molekul do chitosanového roztoku nejprve vede ke vzniku ve vodě rozpustných elektrostatických komplexů až do bodu dosažení kritické micelární koncentrace. Po překročení hodnoty CMC dochází k tvorbě ve vodě nerozpustných komplexů a oddělení fází. Další zvýšení koncentrace SDS poté vede k postupnému opětovnému rozpuštění CS-SDS komplexů.



Obrázek 14: *Emulzifikace* [49]

Geetha a kol. se v referenci [50] zabývají studiem interakcí mezi chitosanem a SDS na molekulární úrovni. Z výsledků této studie je patrné, že SDS se váže na chitosan prostřednictvím vysoce exotermických reakcí a také byl potvrzen fakt, že interakce mají převážně elektrostatický charakter. Interakce chitosanu s anionaktivními tensidy jsou dále řešeny v kapitole 4.

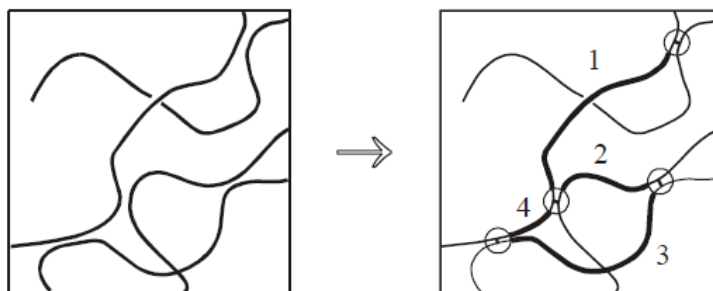
3.4 Gelové systémy

Pod pojmem gel rozumíme trojrozměrnou makromolekulární síť makroskopické velikosti a elastických vlastností [51]. Makromolekulární gely se řadí mezi koloidní disperzní soustavy, kde pevné částice disperzního podílu tvoří trojrozměrnou síť, která je prostoupena spojitou fází disperzního prostředí. Podle toho, zda obsahují nebo neobsahují rozpouštědlo, dělíme gely na **lyogely** a **xerogely**. Lyogely jsou gely obsahující rozpouštědlo a dále se dělí na **hydrogely** (rozpouštědlem je voda), **organogely** (rozpouštědlem je organické rozpouštědlo) a **izogely** (disperzním prostředím je monomer disperzního podílu). Vysušením lyogelu vznikne kompaktní **xerogel**, jehož objem je menší přibližně o objem odstraněného rozpouštědla. Xerogel lze uvést do původního stavu lyogelu nabotnáním. Převod na xerogel je tedy vratný. Tím se makromolekulární gely liší od gelů připravovaných z lyofobních solů, jejichž sušení je nevratné [51]. Gely tedy můžeme dle chování ve vysušeném stavu rozdělit na reverzibilní a ireverzibilní. Dále můžeme gely rozdělit dle povahy disperzního podílu na anorganické a organické, neutrální a iontové (polyelektrolytové), makromolekulární a částicové, též je můžeme rozdělit dle povahy síťování na fyzikálně síťované a chemicky síťované [1].

3.4.1 Vznik gelů

Gely vznikají procesem zvaným **gelace**, pro který je charakteristický tzv. **bod gelace**, což je okamžik objevení trojrozměrné sítě. Před dosažením bodu gelace vzrůstá rozměr oligomerů (agregátů) a po dosažení bodu gelace klesá relativní obsah polymeru / částic v solu a roste elasticita gelu. Bod gelace můžeme stanovit například reometricky. Při gelaci vznikají spoje mezi lineárními řetězci polymeru v roztoku, tyto spoje nazýváme **uzly**, viz obrázek 15. Mechanismus vzniku gelu může být trojí: chemická reakce, změna fyzikálního stavu koloidního roztoku a botnání xerogelu. U fyzikálních gelů převládají v uzlových oblastech van der Waalsovy síly, bipolární síly, vodíkové můstky, hydrofobní interakce nebo zde může

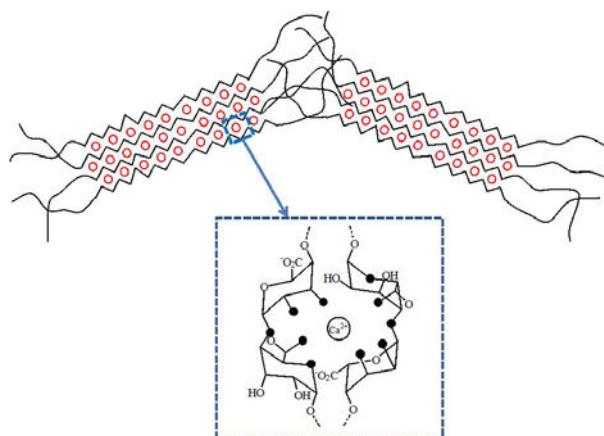
také dojít ke vzájemnému zauzlení řetězců. Kdežto u chemických gelů dochází ke tvorbě sítě pomocí kovalentních vazeb [52]. Tato práce se zabývá gely fyzikálně síťovanými.



Obrázek 15: Proces gelace se znázorněnými uzlovými oblastmi [51]

Gelaci fyzikálních gelů můžeme ovlivnit změnou koncentrace (čím vyšší koncentrace, tím rychleji se gel tvoří), teploty (snížením teploty urychlíme tvorbu gelu) a pH (nejlépe gelace probíhá v izoelektrickém bodě). Fyzikální gely tedy vznikají změnou fyzikálních vlastností, která iniciuje snížení afinity polymerních řetězců, což má za následek iniciace mezi řetězci. Zatímco kovalentní uzly jsou brány za trvanlivé, u fyzikálních uzlů tomu tak není. Uzly mohou v čase zanikat a v jiném uspořádání opět vznikat, mohou se také rozpadat při mechanickém namáhání gelu. *Silné gely* mají pevné spoje, a proto jsou elastické podobně jako kovalentní gely. Uzly *slabých gelů* jsou málo trvanlivé, a proto se tyto sítě chovají elasticky jen při malých mechanických napětích. Účinkem větších napětí uzly zanikají a síť se rozpadá. Překročí-li tedy napětí kritickou hodnotu, zvanou *statická mez toku*, soustava se deformuje trvale [51, 52].

Mezi tři základní mechanismy vzniku fyzikálně síťovaných gelů patří: nedokonalá fázová separace v roztoku amorfního polymeru, nedokonalá krystalizace z roztoku polymeru a asociace specifickými interakcemi. Nejznámější specifické interakce jsou vodíkové vazby, které mají krátkou životnost, neustále zanikají a obnovují se, takže síť složená výhradně z vodíkových vazeb se deformuje trvale jako tekutina. Na výstavbě šroubovice, což je nejčastější typ asociace, některých anionogenních polysacharidů se tímto způsobem podílejí protiionty K^+ nebo Ca^{2+} [51]. Na obrázku 16 je znázorněn vznik alginátového gelu za přítomnosti vápenatých iontů jakožto síťovacích činidel.



Obrázek 16: Síťování alginátu vápenatými ionty [53]

3.4.2 Vlastnosti gelů

Mezi charakteristické mechanické vlastnosti gelů patří jejich viskoelasticita, která se projevuje tak, že jsou schopné až do určité kritické hodnoty odolávat tečnému napětí a chovat se jako elastické tuhé těleso. Hodnota kritického napětí je ovlivněna především počtem a koncentrací uzlů. Čím více je vazeb mezi řetězci polymeru, tím menší je možnost změny tvaru makromolekuly a tím rigidnější je vzniklá prostorová síť. V případě, že síly poutající původní disperzní částice do síťovité struktury jsou velmi slabé, můžeme gel protřepáním převést opět na sol. Působením mechanické síly se ruší slabé vazby mezi částicemi. Tento jev nazýváme **reopexie**. Následně může opět dojít k nové gelaci, ponecháme-li ztekucený sol stát v klidu, což nazýváme **tixotropie**. Tixotropie se neprojevuje u gelů polymerů, jež obsahují různě pevné uzly. V tomto případě se při mechanickém namáhání poruší jen méně pevné vazby a soustava se rozpadá na velké celky, které následně nejsou schopny vytvořit strukturu s původními vlastnostmi [1].

Anizotropií gelů rozumíme změnu lineárních rozměrů vzorku gelu při botnutí gelu, lomu a pohlcování světla i změnu mechanických vlastností. Je způsobena především nerovnoměrnou objemovou kontrakcí při vysoušení nebo deformací při tvorbě gelu. Anizotropii vykazuje většina gelů vyskytujících se v rostlinách nebo v živočišném těle

Stárnutím gelů roste počet styčných bodů gelu a smršťuje se jeho síťovitá struktura. Část přítomné kapaliny je vytlačována na povrch gelu. Tento jev nazýváme **synereze** a můžeme ho podpořit zvýšením teploty či přidáním elektrolytu. Nejčastěji se synereze projevuje u čerstvých gelů.

Elektrická vodivost gelu zůstává téměř stejně vysoká jako u původního solu, ze kterého gel vznikl. Významnou výhodou je fakt, že **difuzivita** nízkomolekulárních látek je o něco menší než v solu, i když při gelaci vzrostla viskozita systému. Difuzivita nízkomolekulárních iontů v gelech není ovlivněna tepelnými konvekcemi ani prouděním díky síťovité struktuře gelu [1].

Mezi další charakteristický proces, který souvisí s reverzibilními gely, patří proces **botnutí**, který již byl částečně popsán v úvodu do kapitoly 3.4. Botnutí rozlišujeme na omezené a neomezené. Omezené botnutí je pohlcování kapaliny xerogelem, které

se zastaví ve stadiu elastického lyogelu a další kapalina již není pohlcována. Neomezené bobtnání se naopak nezastaví ve stadiu lyogelu a jednotlivé makromolekuly tak mohou přejít až do stádia roztoku. Stupeň nabotnění (R_s) je nejčastěji používaný parametr za účelem vyjádření botnací kapacity hydrogelů, je definován takto:

$$R_s = \frac{(W_s - W_D)}{W_D} \quad (1)$$

kde W_s a W_D jsou hmotnosti nabotnaného a vysušeného hydrogelu [54].

3.4.3 Hydrogely

Hydrogely se řadí mezi gely, jejich charakteristickým znakem je značná absorpce vody, aniž by docházelo k jejich rozpuštění. Schopnost vázat vodu je způsobena hydrofilní povahou funkčních skupin vázaných na řetězci, což jsou skupiny hydroxylové ($-OH$), karboxylové ($-COOH$), amidické ($-CONH$) nebo sulfonické ($-SO_3H$) skupiny. Tyto polární skupiny podléhají hydrataci jako první, a to i přes vodíkové můstky či iontové interakce. Molekula chitosanu, kterým se zabývá tato práce, má tři aktivní centra: primární aminoskupinu, primární a sekundární hydroxyskupinu. Z čehož právě hydroxyskupiny podléhají hydrataci a dochází tak k absorpci tzv. primárně vázané vody. Hydratací polárních skupin se prostorová síť hydrogelu zvětšuje, dochází k odkrývání hydrofobních skupin. Hydrofobní skupiny také interagují s vodou a dochází tak k navázání sekundární vody. Primárně a sekundárně vázaná voda bývá označována jako celkově vázaná voda. Prázdný mezisíťový prostor je vyplněn ještě tzv. volně vázanou vodou, která je dovnitř hydrogelu vháněna osmotickou silou [55].

Hydrogely můžeme stejně jako gely rozlišit na chemické a fyzikální. Pro medicínské aplikace nacházejí lepší využití fyzikální hydrogely, jelikož na rozdíl od chemických neobsahují toxické látky. Tato práce se zabývá tzv. **PEC hydrogely** (z angl. *polyelectrolyte complex hydrogels*), které jsou založeny na elektrostatických interakcích mezi polyelektrolytem a tenzidem. Zde byl jako polyelektrolyt zvolen chitosan.

3.4.4 Využití gelů

Gely nacházejí postupem času stále širší uplatnění. V dnešní době mají gely velký význam nejen v potravinářství, kde se používají jako zahušťovadla, ale také ve farmacii, biologii a medicíně. Proces gelace též využívá celá řada výrob, například: výroba vláken, kontaktních čoček, zpracování kůží, aplikace lepidel. V kosmetice jsou gelové přípravky oblíbené pro svoji dobrou roztíratelnost na kůži. Odpařování vody navíc ochlazuje povrch a působí protizánětlivě. Nejvyšší potenciál však v současné době nacházejí v odvětví tkáňového inženýrství, hojení ran či cílené distribuce léčiv.

Reference [56] zmiňuje další možnost využití gelů v environmentálních aplikacích, a to konkrétně huminových hydrogelů, které jsou zde využity ke snížení kontaminace půd rtutí. Reference [57] popisuje přípravu nanogelů složených z chitosanu, thiamin pyrofosfátu (TPP) a alginátu a jejich následné využití v biomedicíně a farmacii. Gely nacházejí své uplatnění také v analytické chemii, reference [58] popisuje stanovení δ -endotoxinů produkovaných bakterií *Bacillus thuringiensis* pomocí SDS-PAGE elektroforézy, tedy

elektroforézy na polyakrylamidovém gelu. Využitím pektinů z rostliny Aloe Vera pro přípravu gelů s využitím v regenerativní medicíně se zabývá reference [59]. Pektin je lineární polysacharid disponující vysokou molekulovou hmotností a nízkým stupněm esterifikace. Léčebné účinky Aloe jsou známy již po tisíciletí, gel z Aloe se zevně aplikuje zvláště na spáleniny, drobnější poranění a odřeniny. Autoři zde popisují extrakci pektinu z Aloe, jeho purifikaci a následnou přípravu s vyhodnocením biokompatibility. Přípravou gelu, který může pojmout živé buňky a živiny se zabývá reference [60], jakožto materiál slibný pro tisk 3D tkání. Na rozdíl od některých předcházejících studií se vyvinutý gel ukázal být dost rigidní na to, aby udržel svůj tvar bez botnění či smrštění, ale také podléhal štěpení trávicími enzymy.

3.5 Reologie

Reologie představuje hlavní metodu použitou v této diplomové práci. Reologie jakožto vědní obor byla založena Eugenem C. Binghamem a Markusem Reinerem roku 1929. Popisuje deformace pevných látek, kapalin nebo plynů vlivem vnějších sil. Tyto deformace mohou být *elastické* nebo *neelastické*. Působíme-li na těleso silou menší než je hodnota kritického (tečného) napětí, po ukončení působení této síly, se těleso opět navrací do svého původního stavu. Jedná se tedy o elastickou deformaci, které je vykazována především tuhými látkami. Pokud ovšem působíme na dané těleso silou větší než je hodnota kritického (tečného) napětí, po ukončení působení této síly se těleso nevrací do původního stavu, ztrácí svou elasticitu a teče. V tomto případě se jedná o neelastickou deformaci. V užším pojetí je tedy reologie nauka o toku látek. Z této definice také vyplývá možné označení toku jakožto viskózní deformace. Mezi těmito dvěma extrémy se nacházejí látky, jejichž odezva na působící deformační sílu záleží na době působení této síly, nazýváme je *viskoelastické* [61].

I když se jedná o poměrně mladý obor, reologie nám umožňuje charakterizovat tokové chování látek v technologických procesech materiálového inženýrství, jelikož většina reálných látek nevykazuje ideální reologické chování, které popisuje Hookův a Newtonův zákon.

Hookův zákon popisuje deformace ideálně elastických pevných látek, u kterých nedochází k disipaci energie. Veškerá energie, spotřebovaná při namáhání tělesa, je po jeho uvolnění opět využita. Chování takovýchto těles připomíná pružinu a deformace je dokonale vratná, neboli elastická. Tečné napětí σ způsobí protažení tělesa o délku Δl . Hookův zákon vyjadřuje rovnice:

$$\sigma = G_e \cdot \frac{\Delta l}{l} = G_e \cdot \varepsilon, \quad (2)$$

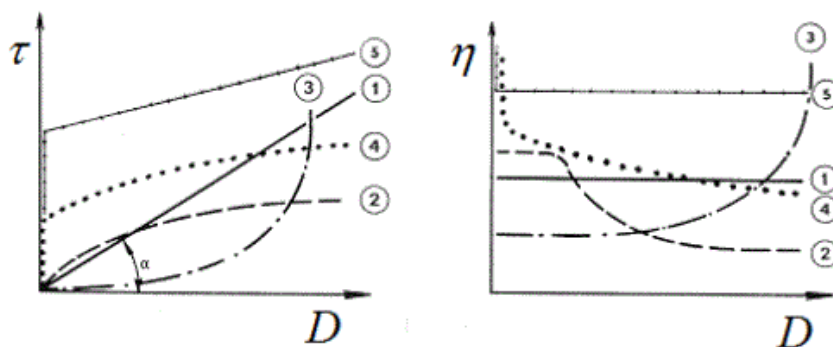
kde $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l}$ představuje tzv. relativní prodloužení neboli deformaci a G_e Youngův modul pružnosti [62].

Newtonův zákon popisuje vztahy pro deformace ideálně viskózních tekutin, především tedy plynů a nízkomolekulárních kapalin, které veškerou vloženou energii disipují na teplo.

Nedochází u nich tedy ke zpětnému využití vložené mechanické energie. Newtonův zákon pro ideálně viskózní látky, *newtonovské*, vyjadřuje rovnice:

$$\sigma_{xy} = \eta \cdot \gamma_{xy}, \quad (3)$$

kde σ_{xy} představuje smykové napětí, η je dynamickou viskozitu a γ_{xy} smykovou rychlost. Z výše uvedeného vztahu je patrné, že viskozita newtonovských látek se při zvyšujícím se tečném napětí nemění. Látky, pro které tento zákon neplatí, se nazývají *neneutronovské*. Jejich viskozita, označovaná zdánlivá viskozita η_0 , je závislá na velikosti tečného napětí nebo rychlosti deformace. Typickými *neneutronovskými* látkami jsou roztoky, taveniny polymerů, suspenze či pasty. Se změnou tečného napětí nebo rychlosti deformace může zdánlivá viskozita růst nebo klesat. *Neneutronovské kapaliny* se dělí na *pseudoplastické kapaliny*, *dilatantní kapaliny* a *plastické kapaliny* [63], viz níže uvedený obrázek 17.



Obrázek 17: Chování kapalin: 1) newtonská, 2) strukturně viskózní, 3) dilatantní, 4) plastická (pseudoplastická), 5) Binghamská [64]

3.5.1 Reologie gelů

Gely se řadí mezi viskoelastické materiály. Vykazují vlastnosti tuhých látek až do určité hodnoty kritického napětí, po překročení tohoto napětí gel přestává aplikovanému napětí odolávat a stává se kapalinou. Hodnota tečného napětí je především ovlivňována koncentrací a pevností uzlů ve struktuře gelu.

Některé typy gelů vykazují při smykovém namáhání **tixotropní vlastnosti**. Ponecháme-li gel po působení smykového napětí v klidu, dochází k obnovení jeho původní struktury a hodnota zdánlivé viskozity se opět postupně zvyšuje a přibližuje k původní hodnotě. Při smykovém namáhání dochází nejprve k porušení nejméně pevných vazeb, proto tyto vlastnosti vykazují gely s různou pevností uzlů. Dochází tak k rozpadu gelu na velké celky, které už nejsou schopny se vrátit do původního stavu a vytvořit původní gel. Existuje však i opačný jev, kdy mechanické namáhání způsobuje vznik gelu, v tomto případě hovoříme o **reopexii** [65].

Účinky deformačního napětí také velmi ovlivňuje rychlost, s jakou jím působíme. Působíme-li dostatečně rychle, elasticita se projeví i u plynů a vody, mezi viskoelastické

látky, tak můžeme zařadit v podstatě všechny materiály. Reologické vlastnosti materiálů charakterizuje tzv. **Debořino číslo**

$$De = \frac{T}{\Delta t}, \quad (1)$$

kde T vyjadřuje materiálový čas a Δt délku trvání deformačního procesu. Pro ideálně neelastické kapaliny je materiálový čas roven nule a Debořino číslo je tedy také nula. Pro ideálně elastické materiály jsou jak materiálový čas tak Debořino číslo rovny nekonečnu. Dosahuje-li Debořino číslo nízkých hodnot, látky chovají jako vazké kapaliny, při vysokých hodnotách jako pružná tělesa [63].

Materiálové vlastnosti gelů, stejně jako všech viskoelastických látek, se obvykle popisují dvěma typy modulů. Prvním modulem je **modul elastický**, používaný pro pevné látky, standardně označovaný jako G' , který vyjadřuje energii uloženou v materiálu během působení napětí a tvoří reálnou část komplexního smykového modulu G^* . Druhým je **modul viskozitní**, používaný pro kapaliny, označovaný jako G'' , který sděluje ztrátu energie během napěťového cyklu. Představuje imaginární složku **komplexního smykového modulu G^*** . Komplexní smykový modul G^* zahrnuje G' i G'' a vyjadřující reologické chování reálných viskoelastických látek. Abychom zjistili přesnou hranici v chování mezi pevnou a kapalnou fází, používáme tzv. **bod překřížení** (z angl. „*crosspoint*“), ve kterém se protne modul elastický s modulem ztrátovým. Z podílu modulu viskozitního G'' a modulu elastického G' získáme **ztrátový úhel δ** :

$$\operatorname{tg} \delta = \frac{G''}{G'}. \quad (5)$$

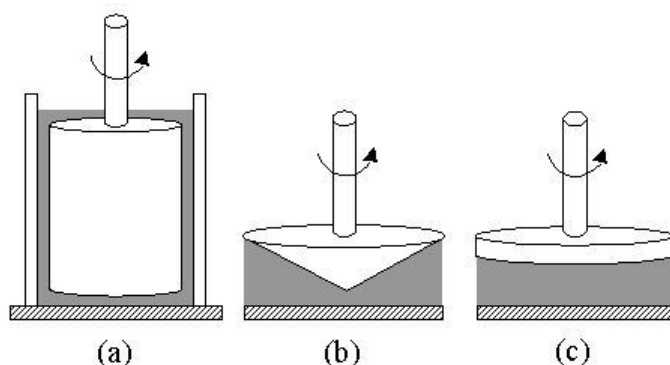
Ztrátový úhel nám umožňuje charakterizovat chování zkoumané látky, z hodnoty úhlu zjistíme, která ze složek převažuje. Když $\delta = 45^\circ$, tak jsou složky v rovnováze a jedná se o látku viskoelastickou. V případě, že $\delta > 45^\circ$, látka vykazuje viskózní chování, jelikož převažuje viskózní složka. Látka naopak vykazuje elastické chování v případě, že $\delta < 45^\circ$ [66, 67]. Ideálně elastický materiál by tedy měl mít hodnotu ztrátového úhlu $\delta = 0^\circ$ a ideálně viskózní látka $\delta = 90^\circ$.

3.5.2 Měřicí systémy

K měření viskozity se běžně používají průtokové, pádové a rotační viskozimetry (neboli reometry), z nichž však pouze poslední typ a speciální kapilární viskozimetry umožňují dostatečně charakterizovat tokovou křivku *nenewtonských* kapalin. Podmínkou správného měření je především laminárnost proudění v celém rozsahu měření a také dobře definovaná geometrie toku v případě *nenewtonských* kapalin. U reometrů se rychlost smykové deformace vypočítá z úhlové rychlosti rotující části a smykové napětí je určeno krouticím momentem. Pro měření smykové deformace u přístroje nastavujeme konstantní smykové napětí a naopak pro měření smykového napětí nastavujeme konstantní rychlost smykové deformace.

Rotační reometr se skládá ze dvou hlavních částí: rotoru, který se otáčí konstantní úhlovou rychlostí a statoru, který představuje statickou část. Druhy měřicí geometrie jsou uvedeny

na obrázku 18, měřící geometrii volíme dle povahy použitého vzorku. Měřící geometrie typu *deska – deska* (uvedená na obrázku 18 (c)) se používá výhradně pro velmi tuhé vzorky, jako jsou například gely. Její hlavní výhodou je malá spotřeba vzorku, hlavní nevýhoda tkví v měření při vysokých smykových rychlostech, kdy může vzorek z přístroje vylétávat. Měřící geometrie typu *kužel – deska* (uvedená na obrázku 18(b)) se vyznačuje různým úhlem zkosení kuželu (obvykle v rozsahu jednotek stupňů), je již vhodná pro kapalnější vzorky. Poslední druhem měřící geometrie je geometrie typu *válec – válec*, viz obrázek 18 (a), která je ideální pro velmi kapalné vzorky. Mezi hlavní nevýhody této geometrie patří vyšší spotřeba vzorku a méně snadné čištění. Existují také tzv. *double gap*, které se řadí k typu *válec – válec*, jež jsou určeny pro výrazně menší objem vzorku [68].



Obrázek 18: Měřící geometrie reometru [68]

Viskoelastické vlastnosti materiálů měříme následujícími typy viskoelastických testů:

- *Statické testy*
- *Dynamické testy*
 - *Relaxační testy*
 - *Oscilační testy*
 - *Frekvenční test*
 - *Amplitudový test*

Mezi další testy patří také *tokové testy*, které se používají ke klasickému stanovení viskozity. Senzor u těchto testů osciluje přesně definovanou frekvencí otáčení, která postupně vzrůstá, hodnota napětí je naopak konstantní. Mezi oscilační testy patří test frekvenční a amplitudový. *Amplitudový test* je založen na konstantní frekvenci oscilací a měnící se amplitudě deformace. Na základě výsledků tohoto testu můžeme určit oblast lineární viskoelasticity (LVO), provádí se před testem frekvenčním. *Frekvenční test* je založen na studiu viskoelastických vlastností při měnící se frekvenci oscilací a konstantní amplitudě deformace (amplitudu deformace je nutno vybírat z lineární viskoelastické oblasti (LVO), aby nedocházelo k výrazným deformacím vzorku). Detailní popis prováděných reologických testů spolu s jejich nastavením je uveden v kapitole 5.6.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Studium interakcí chitosanu se záporně nabitými tenzidy a následné využití těchto interakcí

Autoři Pal, Pan a Saha popisují v referenci [69] výrazně vylepšenou adsorpci záporně nabitých tenzidů na chitosanové perly, jako kontrastní činidlo bylo přidáno barvivo krystalová violet. Chitosanové perly se běžně používají pro odstranění anionogenních tenzidů z vody. Jako anionogenní tenzid byl v této studii použit dodecylsírán sodný (SDS). Hlavní motivací pro tento výzkum bylo stále se zvyšující využití tenzidů v mnoha produktech (mýdla, detergenty, léky a podobné) a s tím související výskyt tenzidů v odpadních vodách. Tenzidy zhoršují kvalitu vody, způsobují výskyt pěny v řekách nebo nepříjemný zápach. Adsorpce je jedním z nejvíce efektivních a nejméně finančně náročných procesů na odstranění tenzidů z vody.

Chitosan byl použit ve formě perel především kvůli většímu povrchu a vyšší porositě. Dochází zde k iontovým interakcím mezi kladně nabitým barvivem a záporně nabitou hydrofilní částí tenzidu, která je již zakotvená v chitosanu, což umožňuje synergistickou adsorpci. Asociativní interakce mezi opačně nabitými tenzidy a chitosanem v gelové formě vedou k tvorbě modifikovaných *scaffoldů*, které mohou být využity pro biomedicínské nebo environmentální aplikace.

Chitosanové perly byly připraveny rozpuštěním chitosanu v 7 obj. % roztoku kyseliny octové tak, aby byla finální koncentrace chitosanu 1,2 hm. %. Roztok byl míchán na magnetické míchačce do úplného rozpuštění a poté ponechán volně několik hodin za účelem odstranění vzduchových bublin. Pro neutralizaci byl následně roztok umístěn do alkalického roztoku obsahujícího vodu, methanol a hydroxid sodný (v poměru 4:5:1), což také způsobilo koagulaci a vytvoření chitosanových perel. Připravené chitosanové perly měly průměr $2,5 \pm 0,23$ mm. Perly byly po promytí destilovanou vodou, v ní také uchovávány.

Ke stanovení koncentrace SDS byla použita spektrofotometrie s využitím barviva akridinová oranž (ACO), jenž má absorpční maximum $\lambda_{\max} = 467$ nm. Přičemž jak SDS, tak ACO jsou rozpustné v toluenu. Do vodného roztoku obsahujícího SDS byla přidána akridinová oranž, ledová kyselina octová a toluen, po protřepání došlo k extrakci a u organické vrstvy obsahující toluen byla změřena absorbance při 467 nm. Z absorbance byla poté vypočtena koncentrace SDS. Koncentrace barviva krystalová violet byla též měřena spektrofotometricky avšak při $\lambda_{\max} = 590$ nm.

Pro všechny experimenty studující adsorpci byl použit stejný objem roztoku tenzidu (10 ml) s danou koncentrací ($0,05 \text{ g/dm}^3$) a daným počtem chitosanových perel. Následně byla spočtena adsorpční kapacita q_e , která je definována jako hmotnost tenzidu vyjádřená v miligramech adsorbovaná na gram suchého sorbentu dle následující rovnice:

$$q_e = \frac{V \cdot (c_0 - c_e)}{m} \quad (6)$$

kde V je objem roztoku tenzidu [dm^3], c_0 představuje počáteční koncentraci tenzidu v roztoku [mg/dm^3], c_e představuje koncentraci tenzidu ve vodné fázi [mg/dm^3], m značí hmotnost použitého adsorbentu [g]. Chitosanové perly se jeví jako vhodné adsorbenty pro barviva a těžké kovy. Experimenty byly prováděny při konstantní teplotě 30°C a konstantní rychlosti míchání (150 ot./min). Zbývající koncentrace SDS v roztoku byla měřena jednou denně. Chitosanové kuličky dokázaly za pět dní adsorbovat SDS s účinností 99 %, přičemž za prvních 24 hodin bylo naabsorbováno téměř 65 % SDS. Adsorpci lze popsat Langmuirovou izotermou. Z výsledků vyplývá, že interakce mezi barvivem a SDS byly jak iontové tak hydrofobní. Interakce mezi barvivem a chitosanem probíhaly prostřednictvím vodíkových můstků či Van der Waalsových sil.

Autoři Tikerar, Johnson a Nitin představují v referenci [70] novou metodu stanovení transportu kyslíku přes emulzní rozhraní olej - voda. Transport kyslíku přes dané rozhraní byl studován prostřednictvím čtyř emulzí, a to: syrovátkový proteinový izolát (WPI), sesítovaný WPI, dodecylsulfát sodný (SDS) a emulze SDS-chitosan. Emulze WPI a SDS se velmi často používají pro enkapsulaci aktivních látek v potravinářství, a proto byly vybrány jako modelové systémy. Byl použit nízkomolekulární chitosan se stupněm deacetylace 75 až 85 %. Emulze SDS byla připravena, podobným způsobem jako emulze WPI, smícháním 0,23 g SDS o koncentraci 20 mM, 1 g barviva, 2,5 obj. % řepkového oleje ve 40 ml destilované vody. Hodnota pH této emulze byla upravena na 3,0 za použití 1 M HCl. Tato hodnota pH byla zvolena proto, aby jednotlivé vrstvy chitosanu mohly být stabilizovány na povrchu SDS. Emulze chitosan-SDS byla připravena smícháním 20 ml emulze SDS a 20 ml 0,4 hm. % roztoku chitosanu. Sekundární emulze byla podrobena působení ultrazvuku po dobu 1,5 minuty. Konečné koncentrace byly: 0,58 hm. % SDS, 0,2 hm. % chitosanu, 2,5 obj. % řepkového oleje.

Tabulka 1 zobrazuje hodnoty průměrné velikosti částic v jednotlivých emulzích měřené metodou dynamického rozptylu světla (DLS). Výsledky ukázaly, že emulze SDS-chitosan vykazovala mírně vyšší průměrnou velikost částic ve srovnání s ostatními emulzemi. To lze vysvětlit flokulací kapek emulze v přítomnosti chitosanu. V tomto případě chitosan může vzhledem k jeho velké molekulové hmotnosti (~300-500 kDa) a prodloužené délce řetězce flokulovat s více molekulami SDS, což vede ke zvětšení velikosti částic. Všechny emulze byly stabilní po dobu nejméně jednoho týdne, nebyla pozorována žádná separace fází.

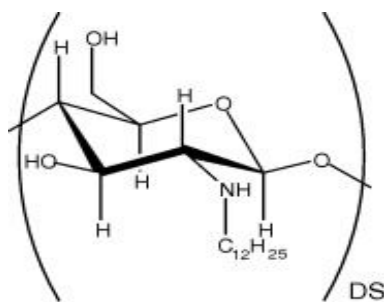
Tabulka 1: Naměřené hodnoty velikosti částic v jednotlivých emulzích [70]

Emulze	Průměrná velikost částic [μm]
WPI	0,75
Zesítovaný WPI	0,76
SDS	0,77
SDS-chitosan	1,02

Pro všechny typy emulzí se efektivní difúzní koeficienty transportu kyslíku pohybovaly v rozmezí $0,14 - 1,16 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2/\text{s}$. Nehledě na nízké hodnoty efektivních difúzních koeficientů vybrané emulze příliš nelimitovaly transport kyslíku přes rozhraní. Emulze jsou jedním z nejčastěji používaných systémů pro enkapsulaci bioaktivních látek. Výsledky této studie zdůrazňují značné problémy v oblasti omezení oxidace bioaktivních látek při současném použití emulzí a také upozorňují na potenciál některých přístupů, mezi které patří například povlakové vrstvy pro omezení přepravy kyslíku.

Onesippe a kol. se v referenci [71] věnovali studii interakcí mezi hydrofobně modifikovaným chitosanem a SDS. Hydrofobně modifikované polymery neboli tzv. asociativní polymery jsou široce používány například v kosmetických přípravcích nebo potravinách, a to vzhledem k jejich biodegradabilitě a antibakteriálním vlastnostem. Alkylovaný chitosan, znázorněný na obrázku 19, se vyznačoval stupněm deacetylace 75 %.

Z měření metodou izotermické titrační kalorimetrie bylo patrné, že SDS se silně váže na opačně nabitý a hydrofobně modifikovaný chitosan ve dvou fázích. Nejprve dochází k velmi silným elektrostatickým vazbám, následovanými nevazebnými oblastmi a poté vznikají koordinačně kovalentní vazby.



Obrázek 19: *Strukturní vzorec alkylovaného chitosanu* [71]

Reference [72] popisuje přípravu semipermeabilních hydrogelů z hydrofilního akrylamidu a přírodního biopolymeru chitosanu. Byly zkoumány interakce těchto hydrogelů s různými povrchově aktivními látkami, a to: anionogenního dodecylsulfátu sodného (SDS), kationogenního *N*-cetyl-*N,N,N*-trimethyl-bromidu a neionogenního Tween 20. Chemická struktura hydrogelů s tenzidy byla zkoumána pomocí infračerveného spektrometru s Fourierovou transformací (FTIR spektroskopií), morfologie hydrogelů byla charakterizována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM).

Hydrogely složené z akrylamidu (AAm) a chitosanu (CS) byly připraveny radikálovou polymerizací za použití persulfátu amonného (APS) a *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiaminu (TMEDA) jakožto redoxních iniciátorů a *N,N'*-methylenbisakrylamidu (MBA), který zde plnil funkci síťovacího činidla. Roztok chitosanu byl připraven rozpuštěním 5 g chitosanu v 5% roztoku kyseliny octové za stálého míchání. V kádince obsahující 2 ml dvakrát destilované vody byl rozpuštěn 14,6 mM roztok AAm a chitosanový roztok o různých objemech. Do tohoto roztoku bylo za stálého míchání přidáno 1 ml 1 hm. % roztoku MBA, 1 ml 5 hm. % roztoku APS a 1 ml 1 hm. % roztoku TMEDA. Po proběhnutí reakce byl hydrogel ponořen do destilované vody při laboratorní teplotě po dobu 24 hodin za účelem

odstranění nezreagovaného materiálu. Poté byly hydrogely sušeny po dobu 2 dnů opět při laboratorní teplotě.

Z výsledků termogravimetrické analýzy je patrná vyšší stabilita gelů s přídavkem SDS oproti ostatním, což je dáno především vysokým stupněm fyzikálního zesílení mezi SDS a polyakrylamid-chitosanovými hydrogely. Hydrogely modifikované jinými povrchově aktivními látkami ukazovaly 90 – 95% rozklad při teplotě 800 °C.

Přípravou chitosanového termoreverzibilního gelu s tetradecylsulfátem sodným (STS) se zabývali vědci v referenci [73], jejich cílem bylo připravit injekčně podávaný gel, který by byl nepropustný pro záření a použitelný pro endovaskulární terapie. Chitosan disponuje schopností tvořit v kombinaci se slabou bází, jako je například β -glycerofosfátová sůl (β -GP), termogel. Termoreverzibilní gel představuje systém, který zůstává při laboratorní teplotě a fyziologickém pH ve formě roztoku, ale při zahřátí na tělesnou teplotu se změní na gel. Ke gelaci tak dochází *in vivo*. Mezi další výhodné vlastnosti chitosanu, které ho předurčují pro toto využití, patří jeho biokompatibilita, schopnost tvořit porézní matici, která může být snadno infiltrována buňkami či jeho mukoadhezivita. Naopak mezi nevýhody chitosanových hydrogelů patří jejich propustnost pro záření, poměrně špatné mechanické vlastnosti a dlouhá doba gelace. Tato studie dokazuje, že přidáním STS do chitosanového gelu dochází ke zvýšení mechanických vlastností, zkrácení doby gelace a gely se stávají nepropustné pro záření. Viskoelastické vlastnosti gelů byly zkoumány pomocí reologie.

Na přípravu gelů byl použit chitosan se střední molekulovou hmotností (420 kDa) a stupněm deacetylace 83 %, 27 % hm. roztok STS s větvenou strukturou (Niaproof), Iopamidol (neionogenní roztok jodu o koncentraci 370 mg/ml, jehož cílem bylo zajištění zvýšení kontrastu po injekční aplikaci gelu), β -glycerofosfátová sůl, která byla přidána za účelem zabránění precipitace. Roztok chitosanu byl připraven rozpuštěním 1 g chitosanu ve 3,2 ml 1 M roztoku HCl, 10 ml Iopamidolu a 18,8 ml deionizované vody při laboratorní teplotě za stálého míchání po dobu 24 hodin. Tento roztok byl následně sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut, poté byl uchováván při teplotě 4 °C. Roztoky STS byly připraveny rozpuštěním ve fosfátovém pufru o hodnotě pH 7. β -GP roztoky s i bez STS byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství β -GP ve vodě nebo roztoku STS. Všechny roztoky β -GP byly smíchány s roztoky chitosanu za vzniku chitosanových gelů (CS) či gelů chitosanu s STS (CS/STS). Koncentrace chitosanu (2 % hm.), β -GP (12 % hm.) a Iopamidolu (20 % obj.) byly udržovány na konstantních hodnotách. Finální koncentrace STS byly následující: 0; 0,1; 1; 2 a 3 % hm.

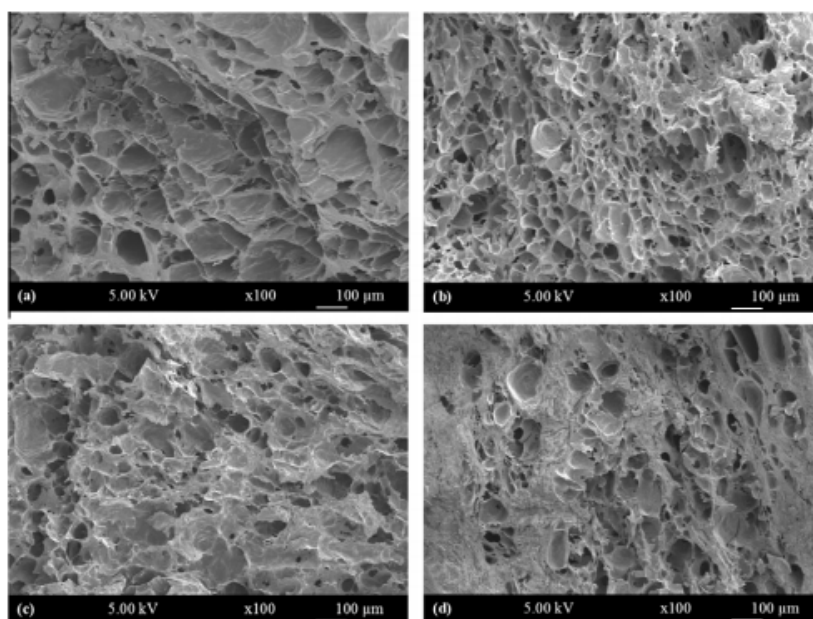
Všechny připravené vzorky byly schopné tvořit hydrogely při fyziologickém pH a při tělesné teplotě. Vytvořené gely byly charakterizovány a optimalizovány pomocí reologie, rastrovací elektronové mikroskopie (SEM), botnací charakterizace a *ex vivo* testů na embolizaci. Pomocí reologie byly vytvořené gely zkoumány při teplotě skladování (6 °C), při laboratorní teplotě (23 °C) a tělesné teplotě (37 °C). Z výsledků je patrné, že u chitosanových gelů bez přídavku STS byl proces tvorby gelu poměrně dlouhý (14,5 min) a pozvolná byla i změna mechanických vlastností. Přídavkem 1–3 % hm. STS se výrazně zrychlila doba gelace, viz tabulka 2. Po přidání povrchově aktivní látky dochází ke smrštění

či redukci chitosanových řetězců vlivem přitažlivých sil. Bylo zjištěno, že gel obsahující 2 % hm. chitosanu, 20 % obj. Iopamidolu, 12 % hm. β -GP a 1–3 % hm. STS, představuje ideální, homogenní hydrogel vhodný k injekčnímu použití.

Tabulka 2: Doba gelace a hodnota pH připravených gelů [73]

Název gelu	STS [% hm.]	β -GP [% hm.]	pH	Doba gelace [min]		
				$T_{\text{gel}}=6\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{gel}}=23\text{ }^{\circ}\text{C}$	$T_{\text{gel}}=37\text{ }^{\circ}\text{C}$
CS	0	12	7,24	Netvoří gel	Netvoří gel	14,7 \pm 2,4
CS	0	20	7,38	Netvoří gel	Netvoří gel	Okamžitě
CS/STS 0,1	0,1	12	7,25	Netvoří gel	Netvoří gel	4,27 \pm 0,42
CS/STS 1	1	12	7,30	Netvoří gel	24,4 \pm 2,0	Okamžitě
CS/STS 2	2	12	7,34	63,9 \pm 11,2	Okamžitě	Okamžitě
CS/STS 3	3	12	7,39	Okamžitě	Okamžitě	Okamžitě

Morfologie připravených hydrogelů byla pozorována pomocí rastrovací elektronové mikroskopie (SEM). Jeden týden staré gely, uchovávané při teplotě 37 °C, byly lyofilizovány a potaženy vrstvou zlata. Z výsledků bylo patrné, že póry měly nepravidelné tvary a jejich průměrná velikost se pohybovala v rozmezí 45 až 100 μm . Jak je patrné z obrázku 20, přídavek STS vedl k menší porositě. U vzorku s obsahem 1 % hm. STS se zmenšila jak propojenost pórů, tak jejich velikost (10–45 μm), tento trend se projevil ještě výrazněji u vzorků s vyšším zastoupením STS.



Obrázek 20: SEM fotografie připravených gelů: a) chitosan bez STS, b) chitosan s 1 % hm. STS, c) chitosan s 2 % hm. STS, d) chitosan s 3 % hm. STS [73]

A. Chenite a kol. se v referenci [74] zabývali neutrálními roztoky chitosanu, které po injekčním podání vytvoří biodegradabilní gel *in situ* bez jakékoliv předchozí chemické modifikace chitosanového roztoku. Tvorba gelu byla zajištěna přidáním solí, a to: glycerol-, sorbitol-, fruktóza- nebo glukóza-fosfátových solí. Dvojice chitosan a fosfátová sůl byla zvolena za účelem vzniku synergických sil, příznivých k tvorbě gelu, mezi které patří vodíkové můstky, elektrostatické interakce a hydrofobní interakce. Tyto soli umožňují chitosanovým roztokům zůstat v kapalném stavu při fyziologickém pH a vytvořit gel při zahřátí na tělesnou teplotu.

Roztoky byly připraveny rozpuštěním 200 mg chitosanu o střední molekulové hmotnosti (550 kDa) a stupni deacetylce 91 % v 9 ml 0,1 M roztoku HCl. K chitosanovému roztoku bylo následně přidáno adekvátní množství fosfátové soli, které bylo v předchozím kroku rozpuštěno v destilované vodě. Z reologických měření bylo patrné, že tvorba gelu probíhá při 37 °C, a to poměrně rychle. Vzhledem k tomu, že vlastnosti chitosanu jsou značně závislé na jeho chemických vlastnostech, mezi které patří především molekulová hmotnost a stupeň deacetylce, byly zkoumány vzorky lišící se právě v těchto parametrech, viz tabulka 3. Bylo zjištěno, že teplota bodu gelace vzrůstá se snižujícím se stupněm deacetylce, zatímco molekulová hmotnost nevykazovala významný vliv na teplotě gelace.

Tabulka 3: *Závislost bodu gelace na stupni deacetylce a molekulové hmotnosti chitosanu* [74]

Stupeň deacetylce chitosanu [%]	M _w [g/mol]	Teplota bodu gelace [°C]
70	80,794·10 ⁴	66
81	12,375·10 ⁴	57
81	41,207·10 ⁴	57
81	84,617·10 ⁴	57
91	55,207·10 ⁴	37

4.2 Studium interakcí *N,N,N*-trimethylchitosanu a následné využití těchto interakcí

Autoři Young a kol. se zabývali v referenci [75] přípravou nanočástic z chondroitin sulfátu a trimethylchitosanu a jejich využitím jakožto nosiče proteinů. Podařilo se jim připravit polyelektrolytové komplexy, které byly nabitě jak kladně tak záporně. Chondroitin sulfát disponuje záporným nábojem, je důležitou složkou pojivové tkáně a chrupavky a je schopen se vázat na jádra proteinů. Na syntézu TMC byl použit chitosan se stupněm deacetylce 93,8 %, syntéza byla dvoukroková podle reference [76]. Hlavní výhodou těchto nanočástic je příprava za mírných podmínek a v krátkém čase, připravené nanočástice nevykazovaly cytotoxicitu.

Cílem vědců v referenci [77] bylo připravit nanočásticové systémy TMC a nízkomolekulárního heparinu. Výsledky přislíbily využití TMC nanočástic pro orální podání nízkomolekulárního heparinu a klinické použitelnosti pro léčení vaskulárních poruch, mezi které patří žilní trombózy či plicní embolie. Nanočástice byly připraveny gelací TMC s thiamin pyrofosfátem (TPP), který zde působil jako síťovací činidlo.

Charakterizací komplexů TMC a alginátu se zabývá reference [78]. TMC nanočástice hrají zásadní roli při podávání léčiv díky jejich excelentním fyzikálně-chemickým vlastnostem. Na TMC nanočástice se již podařilo navázat: inzulin [29, 30], antigeny chřipky [79], antigeny žloutenky typu B [80], monoklonální protilátky [81], peptidy [82], DNA [83] a RNA [84].

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Chitosan	CAS: 9012-76-4, nízká molekulová hmotnost, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: MKBA7256V
	CAS: 9012-76-4, střední molekulová hmotnost, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: SLBF6034V
	CAS: 9012-76-4, střední molekulová hmotnost, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: MKBF9232V
	CAS: 9012-76-4, střední molekulová hmotnost, Brightol Int. Co., č. šarže: BR1007022
SDS	CAS: 151-21-3, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: 71727
STS (lineární)	CAS: 1191-50-0, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: MKBW2829V
STS (větvený, Niaproof)	CAS: 139-88-8, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: MKBT1006V, 27 % hm. roztok ve vodě
Chlorid sodný	CAS: 7647-14-5, Penta s.r.o., č. šarže: 1903200314
Kys. octová	CAS: 64-19-7, Lach Ner s.r.o., č. šarže: 302860205
Octan sodný	CAS: 127-09-3, Penta s.r.o., č. šarže: 1801280113
Azid sodný	CAS: 26628-22-8, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: STBF5650V
Kys. mravenčí	CAS: 64-18-6, Penta s.r.o., č. šarže: 1908050914
Formalehyd	CAS: 50-00-0, Penta s.r.o., č. šarže: 17002230216
Hydroxid sodný	CAS: 1310-73-2, Penta s.r.o., č. šarže: 1810241013
Kys. chlorovodíková	CAS: 7647-01-0, Penta s.r.o., č. šarže: 607001000
Methylen jodid	CAS: 76-88-4, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: STBF5650V
Methylpyrrolidon	CAS: 120-94-5, Honeywell, č. šarže: SZBG1600
Ethanol	CAS: 64-17-5, Penta s.r.o., č. šarže: 194150416
Diethylether	CAS: 60-29-7, Lach Ner s.r.o., č. šarže: PP/2016/06857
Voda	Deionizovaná voda Miliphore; Purelab: ELGA

5.2 Charakterizace chitosanů

5.2.1 Velikostně vylučovací chromatografie-statický rozptyl světla měřený ve více úhlech (SEC-MALS)

Hlavním cílem bylo stanovení molekulové hmotnosti různých typů chitosanů používaných v rámci diplomové práce. Molekulová hmotnost byla stanovována pomocí metody velikostně vylučovací chromatografie (SEC-MALS). Na základě výsledků z těchto měření byl poté vybrán chitosan vhodný pro syntézu *N,N,N*-trimethylchitosanu dle reference [32].

SEC-MALS představuje spojení dvou analytických technik, a to: statický rozptyl světla měřený ve více úhlech (z angl. *Multi-Angle Light Scattering* – MALS) a velikostně vylučovací chromatografie (z angl. *Size Exclusion Chromatography* – SEC). Makromolekuly nejprve prochází chromatografickým systémem, tedy kolonou naplněnou gelem s definovanou velikostí pórů, kde jsou rozděleny dle jejich velikosti, a poté jsou analyzovány pomocí rozptylu světla [85].

Chromatografická část je, u přístroje na Fakultě chemické, tvořena izokratickou pumpou, autodávkačem, odplyňovačem, kolonou (při měření byla použita kolona *PL aquagel OH mixed 8 μm*, což je obecná kolona pro měření v rozsahu 6 kDa až 10 MDa) a detektorem UV-VIS.

Příprava mobilní fáze

Jako mobilní fáze byl použit acetátový pufr, který byl připraven smícháním roztoku kyseliny octové o koncentraci $0,333 \text{ mol/dm}^3$ a roztoku octanu sodného o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$ ve vhodném poměru tak, aby výsledné pH roztoku mělo hodnotu 4,2. Poté byl do mobilní fáze přidán azid sodný o koncentraci 3 mmol/dm^3 za účelem zabránění kontaminace.

Měření

Vzorky chitosanu byly rozpuštěny v acetátovém pufru a před měřením přefiltrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů $0,45 \text{ μm}$. Objem nastříkovaného vzorku do systému činil 100 μl a doba analýzy jednoho vzorku trvala 60 minut. Každý vzorek byl proměřen třikrát.

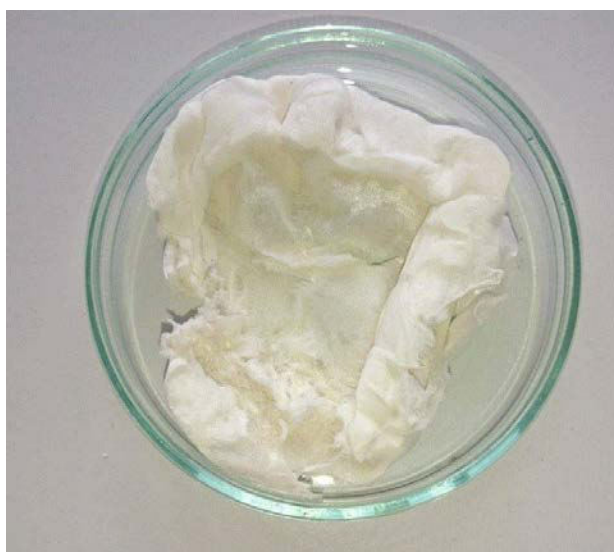
5.3 Syntéza *N,N,N*-trimethylchitosanu

Syntéza TMC byla provedena dle reference [32]. K syntéze byl na základě výsledků měření SEC-MALS, viz kapitola 6.1, vybrán chitosan od firmy Sigma Aldrich s.r.o. s číslem šarže MKBA7256V a hodnotou molekulové hmotnosti 170 kDa. Do 500 ml baňky bylo nejprve přidáno 10,0 g chitosanu, poté 30 ml kyseliny mravenčí, 40 ml formaldehydu a 180 ml destilované vody. K baňce byl připojen zpětný chladič a roztok byl zahříván na teplotu 70 °C a míchán pomocí magnetického míchadla po dobu 118 hodin s rychlostí míchání 150 ot./min. Následně byl světle žlutý, viskózní roztok odpařen na vakuové odparce za sníženého tlaku. Poté byla hodnota pH roztoku upravena pomocí 1 mol/dm^3 roztoku hydroxidu sodného na 12, jelikož při této hodnotě pH dochází ke gelaci. Takto vzniklý gel byl promyt deionizovanou vodou přes fritu za účelem odstranění nečistot. Poté byl DMC

rozpuštěn v deionizované vodě o hodnotě pH 4, čehož bylo docíleno přidavkem 1 mol/dm^3 kyseliny chlorovodíkové, a následně přefiltrován přes fritu. V dalším kroku byl DMC po tři dny dialyzován oproti deionizované vodě, která byla měněna dvakrát denně. Na závěr byl produkt přefiltrován přes filtr o velikosti pórů $0,8 \text{ }\mu\text{m}$. První vzorek byl následně lyofilizován, druhý vzorek lyofilizován nebyl, a to za účelem zkoumání vlivu lyofilizace mezi prvním a druhým krokem syntézy na kvalitu výsledného produktu. Ve druhém kroku se tak u druhého vzorku pracovalo s roztokem DMC, který nebyl na rozdíl od prvního vzorku ředěn deionizovanou vodou.

Ve druhém kroku bylo 250 mg DMC bylo rozpuštěno ve 40 ml deionizované vody a pH bylo upraveno na hodnotu 11 přidáním NaOH vzhledem k tomu, že při tomto pH dochází ke gelaci. Tento krok byl prováděn za účelem zajištění deprotonace terciárních aminoskupin DMC. Následně byl gel promyt vodou a třikrát acetonem. Poté bylo DMC rozpuštěno v 50 ml methylypyrrolidonu s přidavkem 2 ml methylenjodidu. Směs byla umístěna na magnetickou míchačku s rychlostí míchání 150 ot./min, při teplotě $40 \text{ }^\circ\text{C}$ zde byla ponechána po dobu tří dnů a následně umístěna do 150 ml roztoku ethanol : diethylether, který byl v poměru 1 : 1. Vzniklá sraženina TMC byla izolována odstředěním na centrifuze a důkladně promyta diethyletherem. Po sušení přes noc byl TMC rozpuštěn ve 100 ml 10% roztoku chloridu sodného a ponechán na třepačce po dobu 24 hodin za účelem iontové výměny. Na závěr byl TMC opět dialyzován oproti deionizované vodě po dobu 3 dnů, deionizovaná voda byla měněna dvakrát denně, poté následovala filtrace přes $0,8 \text{ }\mu\text{m}$ filtr a lyofilizace.

Bylo nasyntetizováno 0,11 g TMC, který byl lyofilizován mezi prvním a druhým krokem syntézy a 0,12 g TMC, který nebyl lyofilizován mezi prvním a druhým krokem. Vizuálně se tyto dva vzorky nikterak nelišily. Naopak z obrázku 21 je patrné, že *N,N,N*-trimethylchitosan se od nemethylovaného chitosanu vizuálně lišil. Zatímco nemethylovaný chitosan je nažloutlé barvy, TMC má barvu bílou. Struktura TMC byla poměrně lepivá a připomínala pavučinu. Po syntéze následovala charakterizace připraveného produktu.



Obrázek 21: *N,N,N*-trimethylchitosan

5.4 Charakterizace *N,N,N*-trimethylchitosanu

Velmi důležitým úkolem, který následoval po syntéze, byla charakterizace výsledného produktu, která měla za cíl ověřit, zda se skutečně strukturně jedná o *N,N,N*-trimethylchitosan. Při výběru analytických metod bylo bráno v potaz omezené množství nasyntetizovaného produktu. Byly proto vybrány následující metody: velikostně vylučovací chromatografie-statický rozptyl světla měřený ve více úhlech (SEC-MALS), infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, elementární analýza a nukleární magnetická rezonance. U těchto metod činila spotřeba vzorku pouze 1 až 10 mg a zároveň byly schopné potvrdit zdárnou metylaci chitosanu.

5.4.1 SEC-MALS

Metoda SEC-MALS byla použita ke stanovení molekulové hmotnosti nasyntetizovaného TMC, čímž také zjistíme, zda methylace nezpůsobila naštipání chitosanového řetězce. Předpokladem správně provedené methylace tedy byla vyšší molekulová hmotnost produktu syntézy oproti nemethylovanému chitosanu. Samotný popis a princip metody jsou uvedeny v kapitole 5.2.1. Vzorky TMC o hmotnosti 10 mg byly rozpuštěny v deionizované vodě a před měřením přefiltrovány přes stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 μm , aby nedošlo k ucpání kolony. Mobilní fázi představoval neutrální vodný roztok dusičnanu sodného, který se běžně používá pro rutinní měření biopolymerů rozpustných ve vodě. Objem nastříkovaného vzorku do systému činil 100 μl a doba analýzy jednoho vzorku 60 minut. Každý vzorek byl proměřen třikrát.

5.4.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Infračervená spektroskopie je analytická metoda určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin. Metoda je založena na absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem, kde dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Z výsledných hodnot vibračních energií získáváme informaci o pevnosti chemických vazeb, molekulové geometrii a hmotnosti jader, tedy o celé molekulové struktuře [86].

Pomocí infračervené spektroskopie by měla být stanovena přítomnost methylových skupin ve struktuře *N,N,N*-trimethylchitosanu. Hmotnost navážky činila 1 mg. Měřicí rozsah byl 400 – 4000 cm^{-1} s rozlišením 8 cm^{-1} , počet skenů odpovídal 256. Vzorky byly měřeny v modu zeslabené úplné reflektance (z angl. *Attenuated total reflectance ATR*). Maxima absorpčních pásů FTIR spekter byla přiřazena charakteristickým funkčním skupinám pomocí tabelovaných hodnot vibrací funkčních skupin.

5.4.3 Elementární analýza

Nezbytnou charakterizací při zkoumání látek je elementární analýza, která umožňuje stanovit zastoupení základních biogenních prvků (kyslík, uhlík, vodík, dusík a síra). Zde byl hlavním předpokladem úspěšné methylace nárůst procentuálního zastoupení uhlíku a vodíku, případně pokles procentuálního zastoupení dusíku ve srovnání s nemethylovaným chitosanem. Dále byl také sledován trend poměru množství uhlíku ku množství vodíku. Úspěšnou metylaci by v tomto případě potvrdil pokles tohoto poměru u methylovaného chitosanu ve srovnání

s chitosanem nemethylovaným, jelikož zastoupení uhlíku zůstává stejné, kdežto množství vodíku by mělo po methylaci narůstat. Hmotnost navážky činila přibližně 1 mg, pro každý vzorek bylo měření opakováno třikrát. Definované množství vzorku bylo umístěno do kapsle tvořené oxidem cíničitým, která byla zahřívána po dobu jedné hodiny při teplotě 1 000 °C, a tím převedena do plynného stavu. V detektoru bylo poté stanoveno množství oxidů dusíku (ke stanovení dusíku), množství oxidu uhličitého (ke stanovení uhlíku) a množství vodních par (ke stanovení vodíku). Kyslík byl stanoven odečtem naměřených hodnot procentuálního zastoupení dusíku, uhlíku a kyslíku od hodnoty 100 %.

5.4.4 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (NMR) je analytická metoda sloužící ke kvalitativnímu i kvantitativnímu stanovení analyzovaných látek. V organické syntéze patří mezi nejčastěji využívané metody pro stanovení struktur připravených molekul. K této metodě bylo přistoupeno nejen za účelem ověření finální struktury připraveného TMC, ale také za účelem zjištění stupně kvarternizace (DQ).

NMR je založena na měření odezvy atomových jader s nenulovým magnetickým momentem, který je umístěn ve velmi silném magnetickém poli a také jejich interakcí s vysokofrekvenčním elektromagnetickým vlněním. Principem metody je detekce absorpce tzv. radiofrekvenčního záření, které je schopno absorbovat pouze jádro atomu prvku s nenulovým spinovým kvantovým číslem. Příkladem takového atomu může být ^1H , který byl použit i v této práci. Výstup analýzy představuje NMR spektrum, které je pro danou molekulu specifické. Různé funkční skupiny mají specifický signál, který se mění přítomností odlišných substituentů v jejich blízkosti, na základě čehož nám NMR spektrum umožňuje stanovit přesnou strukturu analyzované molekuly [87].

Analýza probíhala dle reference [32] na NMR spektrometru s magnetem 500 MHz při teplotě 80 °C, zvýšení teploty mělo za cíl zajistit úplnou rozpustnost TMC. Jako rozpouštědlo bylo použito D_2O , v němž byl rozpuštěn vzorek o hmotnosti 5 mg. NMR spektra TMC jsou uvedena v článku [32]. Stupeň kvarternizace byl vypočten dle následující rovnice:

$$\text{DQ} = \left[\frac{[(\text{CH}_3)_3]}{[\text{H}]} \cdot \frac{1}{9} \right] \cdot 100, \quad (7)$$

kde $[(\text{CH}_3)_3]$ představuje integrál trimethylovaných aminoskupin při 3,9 ppm, $[\text{H}]$ představuje integrál ^1H v rozmezí 5,1 až 6,1 ppm [32].

5.5 Příprava hydrogelů

5.5.1 Příprava zásobních roztoků

Příprava zásobního roztoku NaCl

Rozpuštěním přesné navážky v deionizované vodě byl připraven roztok NaCl o koncentraci 0,15 M, což odpovídá fyziologickému roztoku. Roztok byl umístěn na magnetickou míchačku s rychlostí míchání 250 ot./min a poté uchováván při laboratorní teplotě.

Příprava zásobního roztoku chitosanu

Navážka chitosanu byla rozpuštěna ve 100 ml 0,15 M NaCl s přidavkem 5 ml kyseliny octové. Do roztoku bylo vloženo magnetické míchadlo a roztok byl ponechán na magnetické míchačce po dobu 24 hodin s rychlostí míchání 250 ot./min. Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci chitosanu 2 % hm. a 0,5 % hm.

Příprava zásobního roztoku tenzidu

Pro oba použité tenzidy (SDS, STS) byl použit obdobný postup přípravy zásobních roztoků. Přesná navážka tenzidu byla smíchána s potřebným množstvím 0,15 mol/dm⁻³ NaCl a roztok byl uložen na magnetickou míchačku na 24 hodin s nastavenou rychlostí míchání 250 ot./min. Byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 200 mM a 50 mM.

5.5.2 Metody přípravy hydrogelů

Hydrogely byly připravovány dle schématu uvedeného v tabulce 4 platného pro každý tenzid.

Tabulka 4: *Schéma přípravy gelů*

Číslo vzorku	Výsledná koncentrace chitosanu ve vzorku [% hm.]	Výsledná koncentrace tenzidu ve vzorku [mM]
1	1	100
2	0,25	25
3	1	25
4	0,25	100

Gely byly připravovány čtyřmi metodami, které jsou popsány níže:

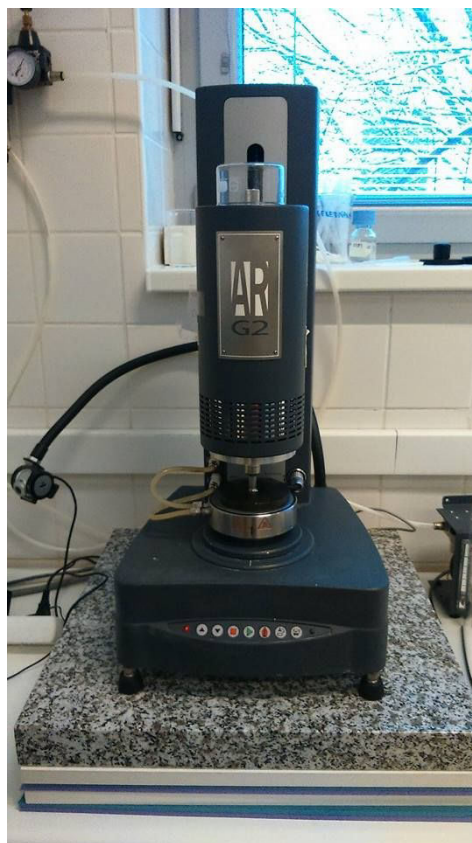
- **Suchá cesta stání:** Příprava vzorků hydrogelů probíhala ve skleněných vialkách. Metoda spočívá ve smíchání přesných navážek chitosanu a tenzidu, které byly následně ve vialkách homogenizovány pomocí tření špachtlí. K homogenizovanému prášku byl následně přilít přesný objem 0,15 M zásobního roztoku NaCl, standardně

6 ml. Výsledný roztok byl po 30 sekund důkladně promíchán pomocí Vortexu a ponechán 24 hodin v klidu. Během této doby došlo k oddělení gelové fáze.

- **Mokrý cesta, stání:** Příprava gelů touto metodou probíhala ve skleněných vialkách, v nichž byly smíchány zásobní roztoky chitosanu a tenzidu v poměru 1:1. Výsledná koncentrace chitosanu i tenzidu je uvedena v tabulce 4. Standardně připravovaný výsledný objem vzniklého roztoku byl 6 ml. Roztok byl posléze po 30 sekund důkladně promíchán pomocí Vortexu a ponechán 24 hodin v klidu k oddělení gelové fáze.
- **Suchá cesta, odstředění:** Postup přípravy je téměř shodný s metodou suchá cesta, stání, avšak míchání vzorků probíhalo ve skleněných centrifugačních zkumavkách. Po homogenizaci a důkladném promíchání roztoku pomocí Vortexu následovalo odstředění vzorku po dobu 15 minut a při 3 500 ot./min na rotační centrifuze ROTOFIX 32 Hettich Zentrifugen.
- **Mokrý cesta, odstředění:** Metoda je obdobná s metodou mokré cesty, stání, kdy jsou do centrifugačních zkumavek smíchány zásobní roztoky v poměru 1:1. Vzniklý roztok je poté homogenizován špachtlí, promíchán prostřednictvím Vortexu a poté odstředěn opět při 3 500 ot./min po dobu 15 minut.

5.6 Reologie

Hlavní metodou určenou k charakterizaci gelů byla reologie, jelikož studium viskoelastických vlastností představuje důležitou charakteristiku hydrogelových vzorků. Reologická měření byla provedena na rotačním reometru AR-G2 TA Instruments, který je znázorněn na obrázku 22. Teplota každého měření byla konstantě zvolena na 25 °C. Byla použita ocelová geometrie typu deska – deska o průměru 25 mm či 8 mm v závislosti na množství vzorku. Geometrie s průměrem 8 mm disponovala také zdrsňným povrchem, jenž zabraňoval prokluzu vzorku. Typ senzoru deska – deska se běžně používá pro polotuhé vzorky. Před začátkem každého měření byl vzorek temperován provedením tzv. „conditioning step“, který sloužil k relaxaci vzorku po dobu 5 minut při nastavené teplotě měření. Vzdálenost horní pohyblivé desky v měřicí poloze od spodní stacionární desky byla stanovena na 100 µm.



Obrázek 22: Reometr AR-G2 TA Instruments

Nejprve byly provedeny testy oscilační, a to konkrétně test amplitudový, následovaný testem frekvenčním. Poté byly provedeny testy tokové. Pro každý test byl použit nový vzorek. Amplitudový test (z angl. *strain sweep test*) vyjadřuje závislost viskoelastických modulů na měnící se amplitudě deformace při konstantní hodnotě frekvence oscilací. Rozsah amplitudy deformace se v průběhu měření mění v rozmezí 0,01–200 %. Hlavním výstupem amplitudového testu je stanovení lineární viskoelastické oblasti (tzv. LVO), ve které jsou viskoelastické moduly nezávislé na amplitudě deformace. Do následujících testů byla vybrána vhodná amplituda deformace, u které bylo dle amplitudového testu potvrzeno, že leží v LVO. Po překročení této hodnoty nastává nevratné porušení uzlů gelu, který již není schopen vrátit se do své původní struktury. Z výsledků je také možné usoudit, zda vzorek vykazuje typické chování elastického tělesa či viskózní kapaliny. Gely lze rovněž porovnat z hlediska rozsahu LVO, kdy vyšší hodnoty amplitudy deformace znamenají rigidnější strukturu gelu. Druhým prováděným testem byl test frekvenční (z angl. *frequency sweep test*) pomocí něhož byla zjištěna závislost elastických a viskózních modulů na frekvenci oscilací. Toto měření probíhalo při konstantní hodnotě amplitudy deformace 1 %, vybrané z LVO, a měnící se frekvenci oscilací senzoru v rozmezí 0,01–20 Hz. Z výsledků můžeme usuzovat mechanické vlastnosti gelu jako celku.

Tokové testy (z angl. *Steady state flow test*) vyjadřují závislost dynamické viskozity vzorku na smykové rychlosti. Smyková rychlost byla nastavena v rozsahu $0,02\text{--}200\text{ s}^{-1}$, kdy v tomto rozsahu přístroj prováděl 21 skenů při počtu pěti bodů na dekádu. Jeden sken trval maximálně 300 sekund a byl omezen hodnotou odchylky viskozit tří opakujících se bodů

měření jednoho skenu 5 %. Pomocí tokových křivek zjišťujeme především viskozitu gelovitého vzorku s následným srovnáním naměřených viskozit u methylovaných a nemethylovaných vzorků.

Pro každý typ testu byl použit nový vzorek. Každý vzorek byl proměřen všemi druhy testů tolikrát, než nastala shoda mezi alespoň dvěma výslednými křivkami z měření.

6 DISKUZE A VÝSLEDKY

6.1 Charakterizace chitosanů

Molekulová hmotnost chitosanu je významnou charakteristikou, která poskytuje informace o vlastnostech chitosanu, jako je rozpustnost, krystalinita, degradace, pevnost v tahu a obsah vlhkosti. S rostoucí molekulovou hmotností získáváme lepší tahové a adsorpční vlastnosti, zvyšuje se schopnost enkapsulace a zpomaluje kinetika uvolňování. Vysokomolekulární chitosan však ztrácí svoji protinádorovou aktivitu [89]. Molekulová hmotnost byla v této práci měřena metodou SEC-MALS, jež je, včetně postupu přípravy vzorků, popsána v kapitole 5.2.1.

Každý vzorek chitosanu byl proměřen třikrát a v tabulce 5 je uvedena výsledná průměrná hodnota. Hodnoty molekulových hmotností se pohybovaly od 170 kDa až po 350 kDa. Cílem tohoto měření bylo především vybrat chitosan vhodný pro syntézu *N,N,N*-trimethylchitosanu dle článku [32], kde pracovali s chitosanem o molekulové hmotnosti 42 kDa. Na základě výsledků měření byl zvolen vzorek č. 1, tedy chitosan s nejnižší dostupnou molekulovou hmotností, a to 170 ± 10 kDa. Dle reference [86] je rozdělení chitosanů podle molekulové hmotnosti následující: nízká molekulová hmotnost (50 – 150 kDa), střední molekulová hmotnost (150 – 700 kDa), vyšší molekulová hmotnost (700 – 1 000 kDa). Vzorky č. 2; 3; 4 se tedy řadí mezi chitosany se střední molekulovou hmotností a naměřená data odpovídají označení uvedené výrobcem. Avšak vzorek č. 1 má podle výrobce nízkou molekulovou hmotnost, ale podle naměřených dat se již řadí ke chitosanům se střední molekulovou hmotností.

Tabulka 5: Naměřené molekulové hmotnosti jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Charakterizace vzorku	M_w [kDa]
1	Nízká molekulová hmotnost, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: MKBA7256V	170 ± 10
2	Střední molekulová hmotnost, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: SLBF6034V	260 ± 15
3	Střední molekulová hmotnost, Sigma Aldrich s.r.o., č. šarže: MKBF9232V	310 ± 10
4	Střední molekulová hmotnost, Brightol Int. Co., č. šarže: BR1007022	350 ± 30

6.2 Charakterizace *N,N,N*-trimethylchitosanu

V následujících podkapitolách jsou vyhodnoceny jednotlivé analytické metody sloužící k charakterizaci výsledného produktu syntézy.

6.2.1 SEC-MALS

Jednou z metod, která by nám měla potvrdit, zda skutečně došlo k methylovaní aminoskupiny chitosanu a vzniku kvartérní soli je metoda SEC-MALS, jež je popsána v podkapitolách 5.2.1 a 5.4.3. Předpokladem správného provedení methylace je nárůst molekulové hmotnosti produktu syntézy oproti nemethylovanému chitosanu, který byl použit jako výchozí látka reakce. Proběhla-li syntéza podle očekávání, byla aminoskupina ($-\text{NH}_2$) substituována methylovými skupinami za vzniku kvartérní amoniové soli ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$). Hodnota molekulové hmotnosti výchozího chitosanu byla v předchozích měřeních, viz kapitola 6.1, stanovena na 170 ± 10 kDa. Hodnoty molekulových hmotností *N,N,N*-trimethylchitosanu jsou uvedeny v tabulce 6, obě hodnoty vykazují nárůst molekulové hmotnosti produktu ve srovnání s výchozí látkou, a to v průměru o 30 kDa. Je zde patrný rozdíl mezi molekulovými hmotnostmi lyofilizovaného TMC a nelyofilizovaného TMC, kdy lyofilizované TMC dosahovalo vyšších hodnot molekulové hmotnosti. Z výsledků je tedy patrné, že methylace proběhla lépe u vzorků, které byly lyofilizovány po prvním i druhém kroku syntézy. Provedení lyofilizace methylaci pomohlo. Dalším faktem potvrzujícím správný průběh substituce je samotná příprava vzorků pro SEC-MALS měření, kdy po navážení 10 mg produktu a zalití 1 ml deionizované vody docházelo k úplnému rozpuštění produktu a vznikal transparentní roztok. Měření molekulové hmotnosti pomocí SEC-MALS tedy predikuje úspěšnou methylaci chitosanu. Abychom si ovšem byli jistí, že methylace byla skutečně úspěšná, byl výsledný produkt methylace charakterizován dalšími metodami uvedenými níže.

Tabulka 6: Naměřené molekulové hmotnosti *N,N,N*-trimethylchitosanu

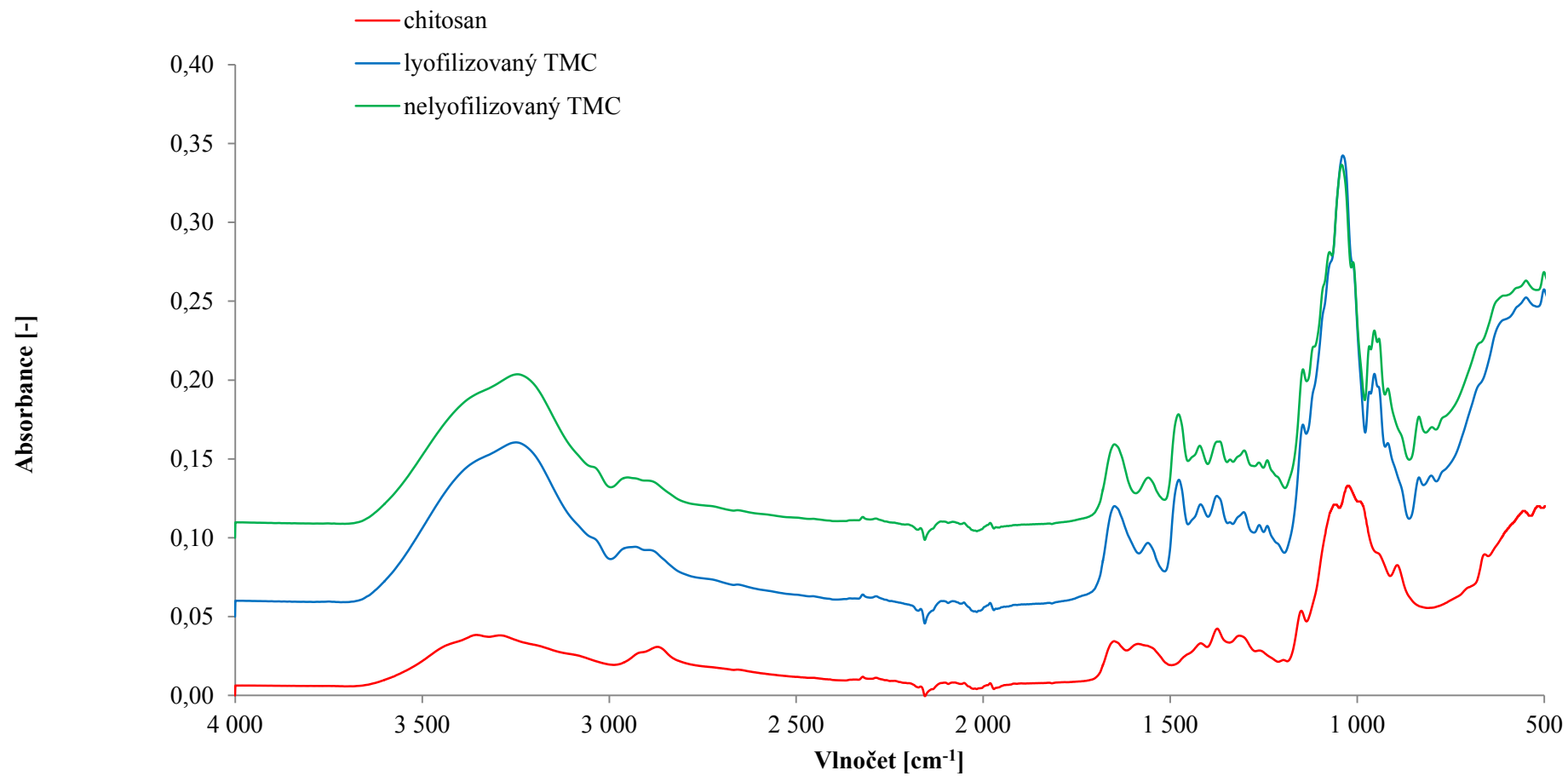
Číslo vzorku	Charakterizace vzorku	M_w [kDa]
1	Lyofilizovaný TMC	208 ± 5
2	Nelyofilizovaný TMC	193 ± 2

6.2.2 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

Pomocí FTIR byly změřeny tři vzorky: nemethylovaný chitosan a dva methylované: TMC lyofilizovaný po prvním i po druhém kroku (označený jako TMC lyofilizovaný) a TMC lyofilizovaný pouze po druhém kroku (označený jako TMC nelyofilizovaný). Získané spektrum je znázorněno na obrázku 23 a představuje závislost absorpance na vlnočtu. Nemethylovaný chitosan disponuje charakteristickými pásy s vlnočty $3353,74 \text{ cm}^{-1}$ a $1585,14 \text{ cm}^{-1}$, které přísluší valenčním vibračním N-H vazeb v primárních aminech ($-\text{NH}_2$). U píku o hodnotě vlnočtu $3353,74 \text{ cm}^{-1}$ je navíc patrné rozdělení na dva píky, jelikož primární aminoskupina obsahuje dva atomy vodíku. U methylovaného chitosanu

(a to jak lyofilizovaného dvakrát, tak lyofilizovaného pouze jednou) je patrné, že tento pík není rozdělený a vibrace jsou posunuté k nižším vlnočtům, konkrétně tedy 3258, 21 cm^{-1} . K posunu směrem k nižším hodnotám vlnočtů docházelo i u druhého píku methylovaných chitosanů o vlnočtu 1585, 14 cm^{-1} , a to k hodnotě vlnočtu 1557,98 cm^{-1} , jež v tomto případě představovaly vibrace sekundárních aminů. Dalším důležitým faktem potvrzujícím úspěšnou methylaci je přítomnost nového pásu při hodnotě vlnočtů 1487,53 cm^{-1} , jež se nachází pouze u methylovaných vzorků a nikoliv u nativního chitosanu. Tyto pásy jsou charakteristické pro valenční vibrace $-\text{CH}_3$ skupin, které jsou přítomné až po methylaci. Jakožto další důkaz slouží srovnání píků odpovídajících valenčním vibracím $-\text{CH}_2$ skupin a píků odpovídajících valenčním vibracím $-\text{CH}_3$ vazeb. U nemethylovaného chitosanu je patrné, že valenční vibrace $-\text{CH}_2$ skupin svou intenzitou převyšují vibrace $-\text{CH}_3$ skupin. U obou methylovaných vzorků naopak pozorujeme nárůst $-\text{CH}_3$ skupin, jelikož valenční vibrace $-\text{CH}_2$ a $-\text{CH}_3$ skupin jsou intenzitně na stejné úrovni. Výše uvedené důkazy nám potvrdily úspěšný průběh methylace a vznik *N,N,N*-trimethylchitosanu.

Další intenzivní pásy, které se projeví u všech tří vzorků, při vlnočtu 1150 – 1050 cm^{-1} představují alkylové skupiny vázané přes kyslík, tedy valenční vibrace vazby C-O-C, kterými jsou spojeny monosacharidové jednotky. V pásu 1050 cm^{-1} je skryta odezva valenčních vibrací vazby C-O hydroxylové skupiny.



Obrázek 23: Infračervené spektrum methylovaného i nemethylovaného chitosanu

6.2.3 Elementární analýza

Třetí metodou sloužící k charakterizaci produktu syntézy byla elementární analýza. V tabulce 7 jsou uvedeny průměrné hodnoty procentuálních zastoupení jednotlivých prvků ve vzorcích, navážky a vypočtené poměry uhlíku k vodíku ze všech tří měření. Opět byly změřeny tři vzorky, a to nemethylovaný chitosan sloužící jakožto srovnávací vzorek a dva methylované lišící se počtem provedených lyofilizací. U procentuálního zastoupení dusíku je patrný pokles po methylaci, jelikož samotnou methylací nedocházelo k nárůstu dusíku, ale pouze k nárůstu uhlíku a především vodíku. U procentuálního zastoupení uhlíku dochází opět k poklesu, avšak menšímu než u dusíku. Pokles dusíku a uhlíku proběhl na úkor nárůstu vodíku. Další hodnotou je poměr C/H, víme-li, že methylací je aminoskupina ($-\text{NH}_2$) substituována methylovými skupinami za vzniku amoniové soli ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$), můžeme předpokládat, že nárůst vodíků bude téměř trojnásobný oproti nárůstu uhlíků, a tak by měl tento poměr C/H po methylaci klesat. Z tabulky je skutečně patrný pokles tohoto poměru jak u TMC lyofilizovaného po prvním i druhém kroku (označený jako TMC lyofilizovaný), tak u TMC lyofilizovaného pouze po druhém kroku syntézy (označený jako TMC nelyofilizovaný).

Tabulka 7: Výsledky elementární analýzy methylovaného i nemethylovaného chitosanu

	N [hm. %]	C [hm. %]	H [hm. %]	O [hm. %]	m [mg]	C/H
Chitosan	7,7±0,1	42,5±0,3	7,9±0,1	41,9±0,5	0,89	5,42±0,04
Nelyofilizovaný TMC	5,4±0,1	41,3±1,0	8,7±0,2	44,5±1,5	0,90	4,77±0,02
Lyofilizovaný TMC	5,1±0,1	39,4±0,8	8,1±0,1	47,4±1,0	0,95	4,87±0,07

6.2.4 Nukleární magnetická rezonance

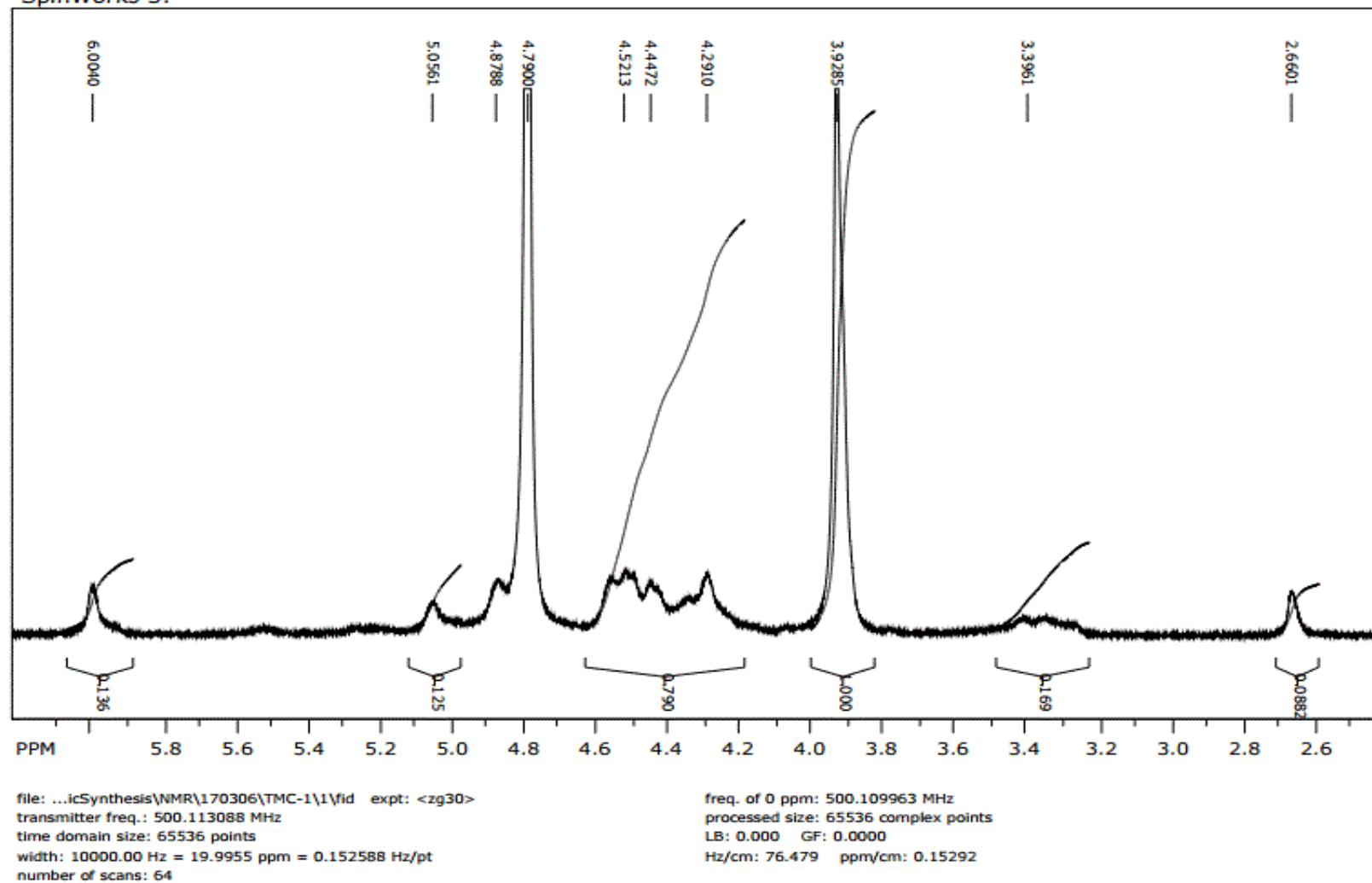
Výstupem měření metodou nukleární magnetické rezonance je spektrum vzorku lyofilizovaného po prvním i druhém kroku syntézy znázorněné na obrázku 24. Srovnáním se spektrem uvedeném v [32] se nám podařilo potvrdit, že produktem substituce je skutečně *N,N,N*-trimethylchitosan. Pík při 4,79 ppm je tabelovaný jakožto pík D_2O , ve kterém byl analyt rozpuštěn, jedná se tedy o reziduální signál rozpouštědla. Pík při 3,93 ppm pak potvrzuje úspěšnou methylaci. Dosazením zintegrovaných hodnot ploch píků do rovnice, které jsou spočteny v dolní části grafu, do rovnice (7) byl vypočten stupeň kvarternizace:

$$\text{DQ} = \left[\frac{[(\text{CH}_3)_3]}{[\text{H}]} \cdot \frac{1}{9} \right] \cdot 100 = \left[\frac{1,000}{0,136} \cdot \frac{1}{9} \right] \cdot 100 = 81,70 \%$$

V článku [32] bylo dosaženo stupně kvarternizace 86 %, hodnota DQ dosažená v této práci se tedy nikterak výrazně neliší. Stupeň kvarternizace TMC neboli hustota náboje, představuje

počet kladných nábojů, které jsou v molekule k dispozici pro interakce, v případě této práce, s negativně nabitými místy tenzidů. V oblasti medicínským aplikací se snažíme dosáhnout, co nejvyššího stupně kvarternizace, a to z důvodu většího počtu interakcí TMC s epitelovou membránou, čímž je zvýšena absorpce léčiv. U TMC se stupněm kvarternizace 60 % a vyšším bylo prokázáno, že účinně zvyšuje jak nosní, tak rektální absorpci inzulínu u potkanů, a to zejména při neutrálních hodnotách pH [24].

SpinWorks 3:



Obrázek 24: NMR spektrum *N,N,N*-trimethylovaného chitosanu

6.2.5 Závěr charakterizace *N,N,N*-trimethylchitosanu

Výše uvedenými analytickými metodami bylo prokázáno, že se podařilo nasyntetizovat *N,N,N*-trimethylchitosan se stupněm kvarternizace 81,7 % a molekulovou hmotností 208 kDa u TMC lyofilizovaného po prvním i po druhém kroku a 193 kDa u TMC lyofilizovaného pouze po druhém kroku syntézy. Rovněž bylo prokázáno, že lyofilizace má na výsledek methylace značný vliv.

6.3 Charakterizace hydrogelů

V této kapitole jsou popsány získané výsledky z měření vlastností i chování připravených polyelektrolytových hydrogelů na bázi kationického polymeru (chitosan, *N,N,N*-trimethylchitosan) a anionického tenzidu (SDS, STS). Nejprve je věnována pozornost vizuální charakterizaci připravených vzorků, poté následují stěžejní reologická měření.

6.3.1 Vizuální charakterizace

Hydrogely chitosan/SDS

Nejprve byly připraveny hydrogely chitosanu s SDS, příprava viz kapitola 5.5.2, u nichž byla zkoumána především metoda přípravy s cílem nalezení optimální metody přípravy gelu. Za ideální gel považujeme s ohledem na potenciální aplikace gel, který je transparentní, pevný na dotek a připravený v dostatečném množství, jeho supernatant by měl být rovněž čirý. Gely z chitosanu a SDS byly připravovány suchou i mokrou cestou, stáním i odstředěním. Dle vizuálního posouzení bylo zjištěno, že způsob přípravy má velký vliv, jelikož suchou cestou se gely připravit nepodařilo. I když bylo do vialek určených pro metodu přípravy suchou cestou přidáno několik kapek 99 obj. % kyseliny octové za účelem usnadnění rozpustnosti chitosanu, gely nevznikly stejně tak i bez přidání kyseliny octové. Výsledky vizuální charakterizace jsou shrnuty v tabulce 8 a gely připravené mokrou cestou odstředěním jsou znázorněny na obrázku 25. Gely připravené mokrou cestou (jak stáním, tak odstředěním) vykazovaly povahu fyzikálně síťovaných gelů, jejichž gelace je založena na působení elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými atomy dusíku volných aminoskupin chitosanu a záporně nabitými atomy kyslíku molekuly SDS. Dle vizuálního pozorování lze tvrdit, že dalším faktorem ovlivňujícím gelaci byla také koncentrace polymeru, jelikož při vyšší koncentraci chitosanu (1 % hm.) bylo gelové fáze větší množství než u vzorků s nižší koncentrací chitosanu (0,25 % hm.). Mezi metodami stání a odstředění nebyly ani u suché ani u mokré cesty vizuálně pozorovány žádné rozdíly, rozdíly mezi metodami byly proto dále zkoumány reologicky. Hlavní výhodou odstředění je menší časová náročnost oproti metodě stání. Za optimální metodu byla zvolena mokrá cesta, jelikož jsou při tomto postupu smíchány již dobře rozpuštěné zásobní roztoky vstupních komponent.

Tabulka 8: *Vizuální charakterizace gelů chitosan/SDS*

Označení vzorku	c SDS [mM]	c chitosanu [% hm.]	Metoda přípravy	Vizuální charakterizace
1	100	1	Mokrý cesta stání	Vytvořená bílá gelová fáze plave na hladině, nezakalený supernatant, vrypem se netáhne, velmi rigidní, velké množství vytvořeného gelu
2	25	0,25	Mokrý cesta stání	Bílá gelová fáze, nekompatní, zakalený supernatant, vrypem se netáhne, menší množství vytvořeného gelu
3	25	1	Mokrý cesta stání	Bílá kompaktní gelová fáze, téměř žádný supernatant, vrypem se netáhne, rigidní, největší množství vytvořeného gelu
4	100	0,25	Mokrý cesta stání	Bílá gelová fáze, nekompatní, zakalený supernatant, vrypem se netáhne, menší množství vytvořeného gelu
1	100	1	Mokrý cesta odstředění	Průhledná kompaktní gelová fáze, supernatant bez zákalu, vrypem se netáhne, velmi rigidní, velké množství vytvořeného gelu
2	25	0,25	Mokrý cesta odstředění	Bílá kompaktní gelová fáze, supernatant bez zákalu, vrypem se netáhne, rigidní, menší množství vytvořeného gelu
3	25	1	Mokrý cesta odstředění	Zakalená kompaktní gelová fáze, supernatant téměř žádný, vrypem se netáhne, rigidní, největší množství vytvořeného gelu
4	100	0,25	Mokrý cesta odstředění	Bílá kompaktní gelová fáze, supernatant bez zákalu, vrypem se netáhne, rigidní, nejmenší množství vytvořeného gelu
1	100	1	Suchá cesta stání	Bílá nesoudržná fáze usazená na dně, dá se roztřepat, nevzniká gel
2	25	0,25	Suchá cesta stání	Bílá nesoudržná fáze usazená na dně, dá se roztřepat, nevzniká gel
3	25	1	Suchá cesta stání	Bílá lepivá fáze, téměř žádný supernatant, nevzniká gel

4	100	0,25	Suchá cesta stání	Na dně usazený nerozpuštěný chitosan, nevzniká gel
1	100	1	Suchá cesta odstředění	Bílá nesoudržná fáze usazená na dně, dá se roztřepat, nevzniká gel
2	25	0,25	Suchá cesta odstředění	Bílá nesoudržná fáze usazená na dně, dá se roztřepat, nevzniká gel
3	25	1	Suchá cesta odstředění	Bílá lepivá fáze, téměř žádný supernatant, nevzniká gel
4	100	0,25	Suchá cesta odstředění	Na dně usazený nerozpuštěný chitosan, nevzniká gel



Obrázek 25: Gely chitosan/SDS připravené mokrou cestou odstředěním

Hydrogely chitosan/STS

Následně byly připraveny gely, kde jakožto kladně nabitý polyelektrolyt působil opět chitosan, avšak za záporně nabitý tenzid byl tentokrát zvolen STS s lineární strukturou. Metody přípravy byly zúženy pouze na mokrou cestu stání a mokrou cestu odstředění. Suchá cesta nebyla použita především kvůli problémům s rozpustností chitosanu popsáním výše. U těchto vzorků byl opět předpokládán vznik fyzikálně síťovaných gelů založených na působení elektrostatických interakcí mezi kladně nabitými atomy dusíku volných aminoskupin chitosanu a záporně nabitými atomy kyslíku molekuly STS, avšak gely se připravit nepodařilo. Ve vialkách vznikl pouze zakalený roztok, u vzorků nebyla patrná gelace, a tak nebyly proměřeny na reometru. Navzdory tomu, že strukturně jsou si SDS a STS podobné a u vzorků chitosan/SDS připravených mokrou cestou se jednalo o gely ve všech případech, budou zde zřejmě hrát roli další parametry. Jedním z těchto parametrů může být například: pH, iontová síla, teplota či kritická micelární koncentrace (CMC) tenzidů. CMC má u SDS při teplotě 20 – 25 °C hodnotu 8 mM, kdežto u STS při stejném teplotním rozmezí již 2,2 mM [90], tvorba gelu by proto u námi zvolených koncentrací probíhat měla. Dalším

parametrem, který by mohl ovlivňovat gelaci STS je teplota. Na základě rešerše víme, že STS v referenci [73] tvořilo gel až při teplotě 37 °C, nikoliv při teplotách nižších (6 °C a 23 °C). Proto bylo v dalších měřeních přistoupeno ke zvýšení teploty a vzorky byly po smíchání jednotlivých komponent temperovány na teplotu 40 °C. Metodou přípravy byla mokrá cesta stání. V dalších kapitolách byl rovněž prověřen vliv iontové síly a pH. Vzorky připravené mokrou cestou stáním jsou znázorněny na obrázku 26.



Obrázek 26: Vzorky chitosan/STS připravené mokrou cestou stáním

Vliv pH a iontové síly na hydrogely chitosan/SDS

Mezi parametry, které mají vliv na proces gelace patří pH a iontová síla, jež byly v této práci zkoumány. Vliv pH na přípravu směsných hydrogelů byl ověřován tím způsobem, že gely byly připravovány v pufrch o definovaném pH. Jako vhodný pufr byl zvolen pufr acetátový, jelikož z předchozích měření na SEC-MALS bylo známo, že se chitosan v tomto pufru rozpouští. Vzhledem k rozsahu pH acetátového pufru 3,6 – 5,6 byly zvoleny následující pH připravovaných pufrů: 3,6; 4,6 a 5,6. Pro každou z hodnot pH byly připraveny dva pufrы o dvou různých iontových silách. Hodnoty iontových sil byly zvoleny následovně: 150 mM, jež představuje fyziologický roztok a 10 mM, jakožto co nejnižší iontová síla. Gely byly opět připravovány podle schéma uvedeného v tabulce 4 metodou mokré cesty stání. Navážky chitosanu a SDS byly rozpuštěny v připravených pufrch a ponechány na magnetické míchačce (s rychlostí otáček 250 ot./min) přes noc. U připravených hydrogelů byl pozorován jak vliv pH, tak značný vliv iontové síly. Iontová síla je veličina charakterizující celkovou „koncentraci náboje“ v roztoku. Při nižší hodnotě iontové síly (10 mM) gely nevznikaly vůbec. Při vyšší hodnotě iontové síly (150 mM) vznikaly gely pouze u vzorků č. 1 a 3, tedy těch, které obsahovaly 1 % hm. chitosanu. Tyto dva vzorky však byly na pohled velmi nehomogenní při hodnotách pH 3,6 a 4,6, ke gelaci docházelo pouze na povrchu a uvnitř byly vyplněny vodou. Z reologického hlediska se ovšem jednalo o viskoelastický materiál s převahou elasticity ($G' > G''$). Vzniklý gel je znázorněn na obrázku 27. V tabulce 9 jsou vizuálně popsány gely chitosan/SDS při pH=3,6 a obou iontových silách, jelikož nebyly pozorovány rozdíly při hodnotě pH 4,6, platí tyto charakterizace i pro vzorky o hodnotě pH 4,6, jež jsou znázorněny na obrázku 28. Naopak ideálních gelů (transparentní, pevný na dotek a připravený v dostatečném množství, jeho supernatant by měl být rovněž čirý) bylo

dosaženo při nejvyšší hodnotě pH, tedy 5,6, a vyšší hodnotě iontové síly pufru, tedy 150 mM, ale opět pouze u vzorků číslo 1 a 3, tedy těch obsahujících 1 % hm. chitosanu. U těchto vzorků došlo k tvorbě bílého gelu, který byl již na první pohled více homogenní než u gelů připravených při pH 3,6 a 4,6. Ke gelaci docházelo i uvnitř, nikoli pouze na povrchu, supernatant se nevytvořil téměř žádný a byl transparentní. Gely byly rigidní, vrypem se netáhly. Větší množství gelu vzniklo u vzorku č. 3.



Obrázek 27: Připravený gel chitosan/SDS při pH=3,6 a IS=150 mM

Tabulka 9: Vizuální charakterizace gelů chitosan/SDS při pH=3,6 a IS=150 mM

Číslo vzorku	c SDS [mM]	c chitosanu [% hm.]	Iontová síla [mM]	Vizuální charakterizace
1	100	1	150	Vznik gelového řetězce perel, perly vyplněny vodou, gel zakalený, supernatant čirý
2	25	0,25	150	Nevzniká gel, pouze zakalený roztok
3	25	1	150	Vznik shluku gelových perel, perly vyplněny vodou, gel zakalený, supernatant čirý
4	100	0,25	150	Nevzniká gel, pouze zakalený roztok
1	100	1	10	Nevzniká gel, chitosan je usazený na dně vialky, roztok lehce zabarvený do žluta
2	25	0,25	10	Nevzniká gel, pouze zakalený bílý roztok
3	25	1	10	Nevzniká gel, chitosan je usazený na dně vialky, roztok lehce zabarvený do žluta
4	100	0,25	10	Nevzniká gel, pouze zakalený bílý roztok



Obrázek 28: Připravené gely/roztoky chitosanu/SDS při $\text{pH}=4,6$ a $\text{IS}=150\text{mM}$

Vliv pH a iontové síly na hydrogely chitosan/STS

Vliv pH a iontové síly byl prověřen také u vzorků chitosanu s STS. STS bylo v tomto případě použito s větvenou strukturou. Stejně jako u SDS bylo připraveno šest zásobních roztoků pufrů o hodnotách pH 3,6; 4,6 a 5,6, pro každou hodnotu pH byly připraveny dva pufrы o iontových silách 10 mM a 150 mM. V potřebném objemu pufrů byl rozpuštěn jak chitosan, tak STS a následně byly napipetovány 3 ml chitosanu rozpuštěného v pufru a 3 ml STS rozpuštěného v pufru dle tabulky 4. Vzorky byly připravovány metodou mokré cesty stání, kdy byly temperovány při teplotě 40 °C. Stejně jako u SDS i zde byl pozorován značný vliv iontové síly pufru, v pufrech o hodnotě iontové síly 10 mM se žádný gel nepodařilo připravit. U hodnot pH 3,6 a 4,6 nebyly vizuálně pozorovány žádné rozdíly, pozorování jsou shrnuta v tabulce 10. Gely se opět podařilo připravit pouze u vzorků s vyšší iontovou silou a s vyšším obsahem chitosanu, tedy č. 1 a 3 a pouze při pH 3,6 a 4,6. Naopak u hodnoty pH 5,6 se nepodařilo připravit žádný gel. Obrázek 29 znázorňuje připravené gely.

Tabulka 10: Vizuální charakterizace gelů chitosan/STS při $pH=3,6$ a $IS=150\text{ mM}$

Číslo vzorku	c STS [mM]	c chitosanu [% hm.]	Iontová síla [mM]	Vizuální charakterizace
1	100	1	150	Bílá gelová kompaktní hmota, supernatant čirý, vrypem se netáhne
2	25	0,25	150	Nevzniká gel, pouze zakalený roztok
3	25	1	150	Bílá gelová kompaktní hmota, supernatant čirý, vrypem se netáhne, méně supernatantu a více gelu oproti vzorku č. 1
4	100	0,25	150	Nevzniká gel, pouze zakalený roztok
1	100	1	10	Nevzniká gel, chitosan je usazený na dně vialky, roztok lehce zabarvený do žluta
2	25	0,25	10	Nevzniká gel, pouze zakalený bílý roztok
3	25	1	10	Nevzniká gel, chitosan je usazený na dně vialky, roztok lehce zabarvený do žluta
4	100	0,25	10	Nevzniká gel, pouze zakalený bílý roztok



Obrázek 29: Připravené gely/roztoky chitosanu/STS při $pH=3,6$ a $IS=150\text{ mM}$

Hydrogely *N,N,N*-trimethylchitosan/SDS a *N,N,N*-trimethylchitosan/STS

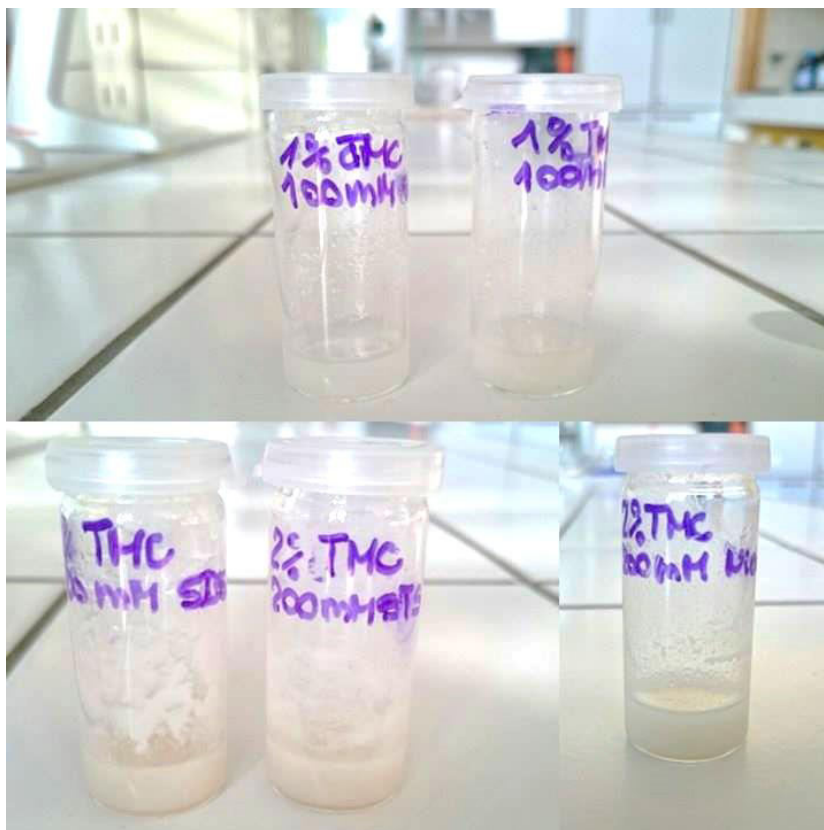
Po úspěšné syntéze a charakterizaci *N,N,N*-trimethylchitosanu bylo přistoupeno k přípravě gelů obsahujících kladně nabitý TMC a záporně nabitě tenzidy, tedy SDS a STS, a to jak s lineární, tak s větvenou strukturou. Jelikož se jedná o dosud nestudovanou a nepublikovanou problematiku a jedná se o pilotní měření, byly zvoleny stejné vstupní koncentrace TMC i tenzidů, jako tomu bylo v předchozích případech přípravy gelů

chitosan/SDS a chitosan/STS, které byly rozpuštěny v 150 mM roztoku NaCl. Z výsledků přípravy chitosanových gelů víme, že gelace bylo dosaženo u vyšší použité koncentrace polymeru. Proto byla i v tomto případě zvolena počáteční koncentrace TMC na 1 % hm., která byla posléze navýšena na 2 % hm. Zvolené koncentrace vzorků jsou shrnuty v tabulce 11. Metodou přípravy byla opět zvolena mokrá cesta stání. V případě TMC by jistě bylo zajímavé vyzkoušet taktéž suchou cestu přípravy, jelikož zde by rozpustnost TMC neměla přípravu nikterak omezovat, na rozdíl od rozpustnosti nemethylovaného chitosanu. Bohužel však množství nasyntetizovaného *N,N,N*-trimethylchitosanu bylo pro tyto účely nedostatečné. Z tohoto důvodu byly vzorky rovněž připravovány v menším objemu, tedy smícháním 1 ml TMC a 1 ml tenzidu.

Tabulka 11: Zvolené koncentrace připravovaných vzorků TMC s tenzidy

Číslo vzorku	Použitý tenzid	Výsledná c tenzidu [mM]	Použitý TMC	Výsledná c TMC [% hm.]
1	SDS	100	lyofilizovaný 2x	1
2	STS větvený	100	lyofilizovaný 2x	1
3	SDS	200	lyofilizovaný 1x	2
4	STS lineární	200	lyofilizovaný 1x	2
5	STS větvený	200	lyofilizovaný 1x	2

Celkem tedy bylo připraveno pět vzorků, postup přípravy viz 5.5, které jsou znázorněny na obrázku 30. Z obrázku je patrné, že u žádného ze vzorků nedošlo k tvorbě tzv. ideálního gelu, tedy gelu, který je transparentní, pevný na dotek a připravený v dostatečném množství, jeho supernatant by měl být rovněž čirý. V případě těchto vzorků docházelo ke tvorbě tzv. mikrogelů, které vznikaly na stěnách vialek. Mikrogel je gel vytvořený ze sítě mikroskopických vláken polymeru a rozměry takto vytvořeného mikrogelu spadají do mikroměřítko. Tyto mikrogely měly bílou barvu, byly homogenní a pevné na dotek, bohužel však byly pouze v omezeném množství. Největšího množství mikrogelu se podařilo připravit u vzorků: 3) 2 % hm. TMC, 200 mM SDS a 4) 2 % hm. TMC, 200 mM STS lineární. Je tedy patrné, že koncentrace TMC i tenzidu měla na přípravu značný vliv, stejně jako struktura tetradecylsulfátu sodného. Jelikož u STS vznikalo větší množství mikrogelu u tenzidu s lineární strukturou. Ve snaze získat, co největší množství gelu byly vzorky podrobeny centrifugaci po dobu 10 minut při 4 000 ot./min na rotační centrifuze ROTOFIX 32 Hettich Zentrifugen. Avšak ani centrifugace nepomohla zajistit větší množství gelu. Pozitivním faktem je zjištění, že zde dochází k interakci mezi *N,N,N*-trimethylchitosanem a opačně nabitými tenzidy. Množství takto vytvořených gelů bylo dostatečné k uskutečnění reologickým měření, jež jsou popsány v další kapitole.



Obrázek 30: Připravené mikrogely TMC/tenzid,
horní řada zleva: 1) 1 % hm. TMC, 100 mM SDS, 2) 1 % hm. TMC, 100 mM STS větvený,
dolní řada zleva: 3) 2 % hm. TMC, 200 mM SDS, 4) 2 % hm. TMC, 200 mM STS lineární,
5) 2 % hm. TMC, 200 mM STS větvený

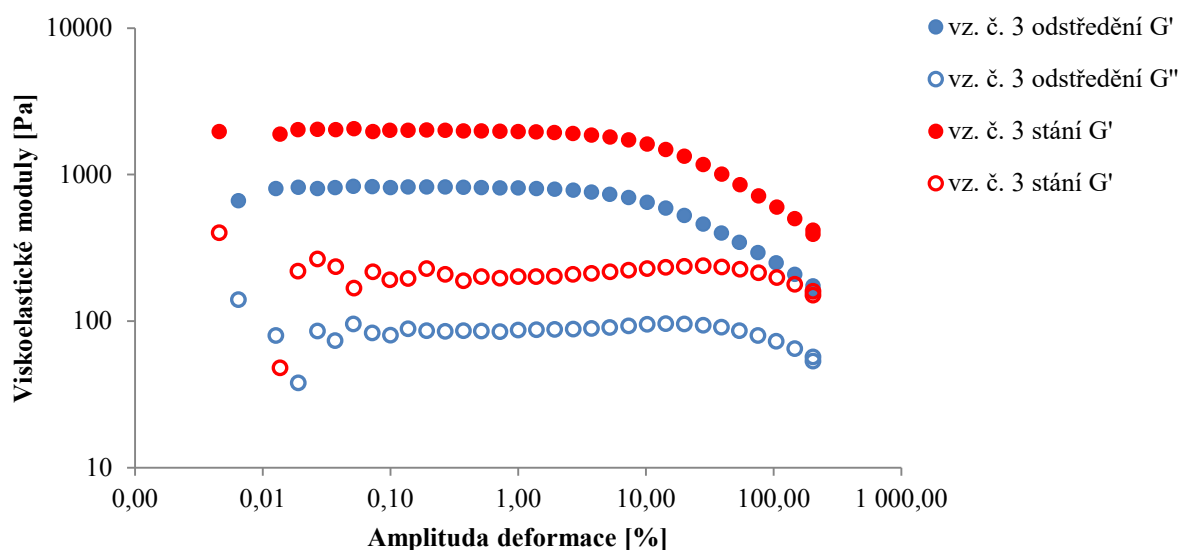
6.3.2 Reologie

Následující kapitola shrnuje poznatky z reologických měření chování hydrogelů na bázi chitosan/SDS či chitosan/STS a dále také TMC/SDS, TMC/STS. Reologie představuje stěžejní metodu této práce, jelikož nám umožňuje základní charakteristiku připravených gelů. Příprava vzorku je popsána v kapitole 5.6.1. Pro měření byly vybrány následující vzorky, které vykazovaly vizuální charakteristiky gelů: celá čtveřice gelů chitosan/SDS připravených mokrou cestou jak odstředěním, tak stáním, dále vzorky č.1 a 3 gelů chitosan/SDS při pH 3,6; 4,6 a 5,6 a iontové síle 150 mM, u gelů chitosan/STS vzorky č.1 a 3 při pH 3,6 a 4,6 a iontové síle 150 mM. Všechny připravené mikrogely *N,N,N*-trimethylchitosanu byly rovněž vybrány pro reologická měření. U každého vzorku byly provedeny testy oscilační („frequency“ a „strain sweep“) a testy tokové. Byla sledována především viskoelastická vzorků, jež je typickou vlastností gelů.

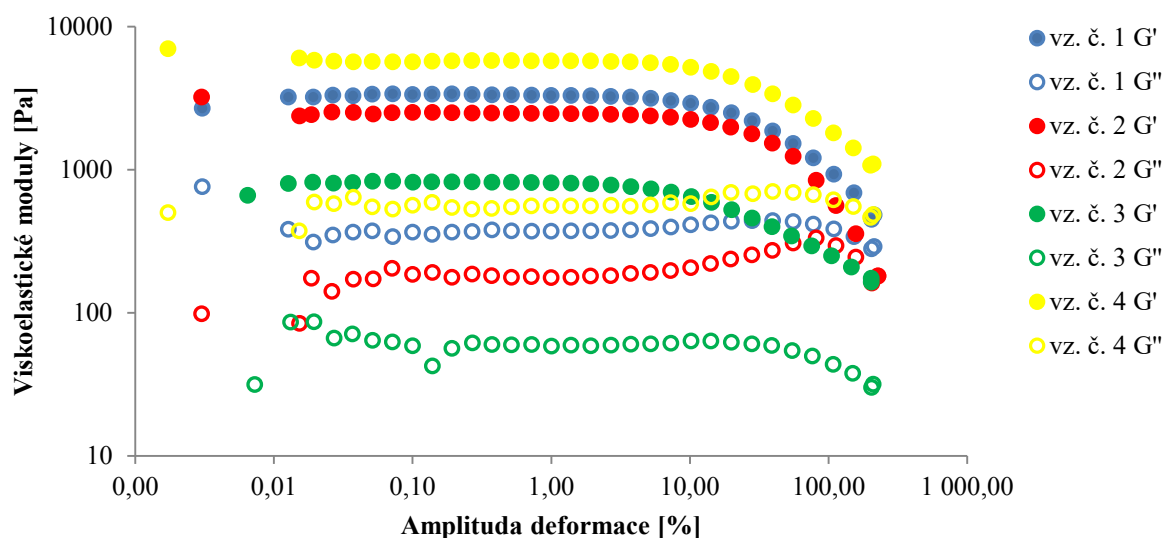
Hydrogely chitosan/SDS

Jako první byl u připravených gelů proveden „strain sweep“, což je deformační test s měnící se amplitudou deformace při konstantní frekvenci oscilací. Z výsledků bylo patrné, že připravené gely jsou konzistentní, a to porovnáním měření vzorků stejných koncentrací odebraných z různých vial. Vzorky tedy lze připravovat reprodukovatelně. U všech připravených vzorků bylo potvrzeno, že se jedná o gely, jelikož elastický modul G'

převyšoval modul viskózní G'' v celém rozsahu měření. Dále byl také zkoumán vliv metody přípravy, jelikož se suchou cestou gely chitosan/SDS připravit nepodařilo, byl zkoumán pouze vliv metod mokré cesty odstředění a stání, ve kterých nebyl shledán žádný statisticky významný rozdíl. Na obrázku 31 je znázorněno srovnání těchto dvou metod u vzorku č. 3, tedy gelu vzniklého smíšením 50 mM SDS a 2 % hm. chitosanu. Zajímavým faktem je také poměrně široká oblast lineární viskoelastivity, jež představuje odezvu modulů nezávislou na aplikované amplitudě deformace. Tato oblast je u všech vzorků v rozmezí 0,01 – 10 % amplitudy deformace. Za touto hodnotou již je gel nevratně zdeformován. Obrázek 32 představuje srovnání jednotlivých gelů připravených mokrou cestou odstředěním lišících se koncentrací chitosanu a SDS dle tabulky 4. Z hlediska absolutních hodnot viskoelastických modulů je patrné, že vyšších hodnot dosahovaly vzorky připravené metodou mokré cesty odstředění. Tyto vzorky tedy byly více rigidní oproti vzorkům připraveným mokrou cestou stáním. Na základě tohoto testu byla pro test frekvenční („frequency sweep“) zvolena konstantní amplituda deformace 1 %.

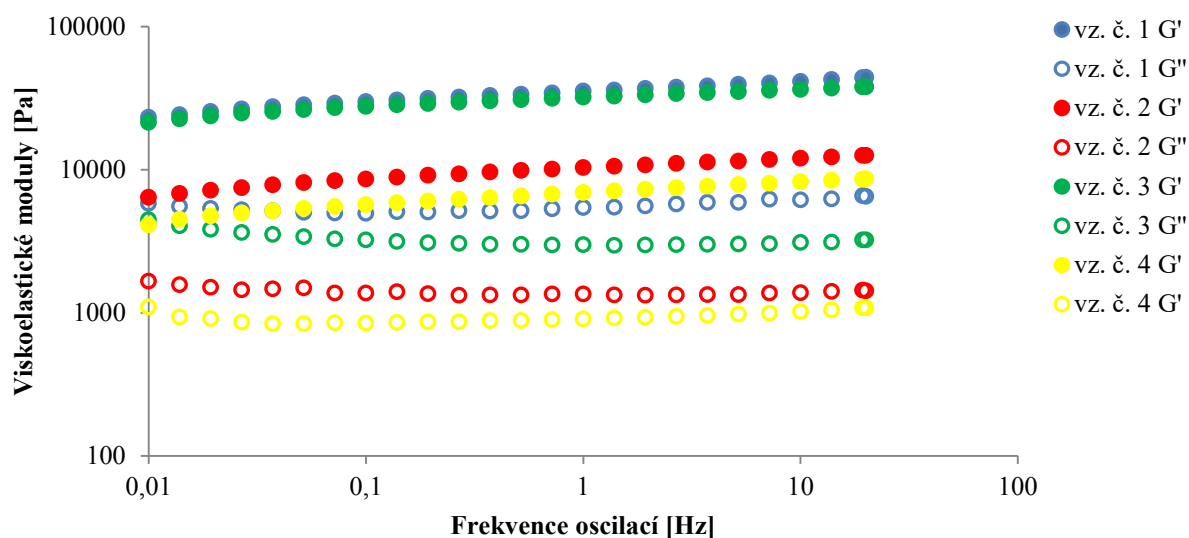


Obrázek 31: Srovnání metod přípravy odstředěním a stáním



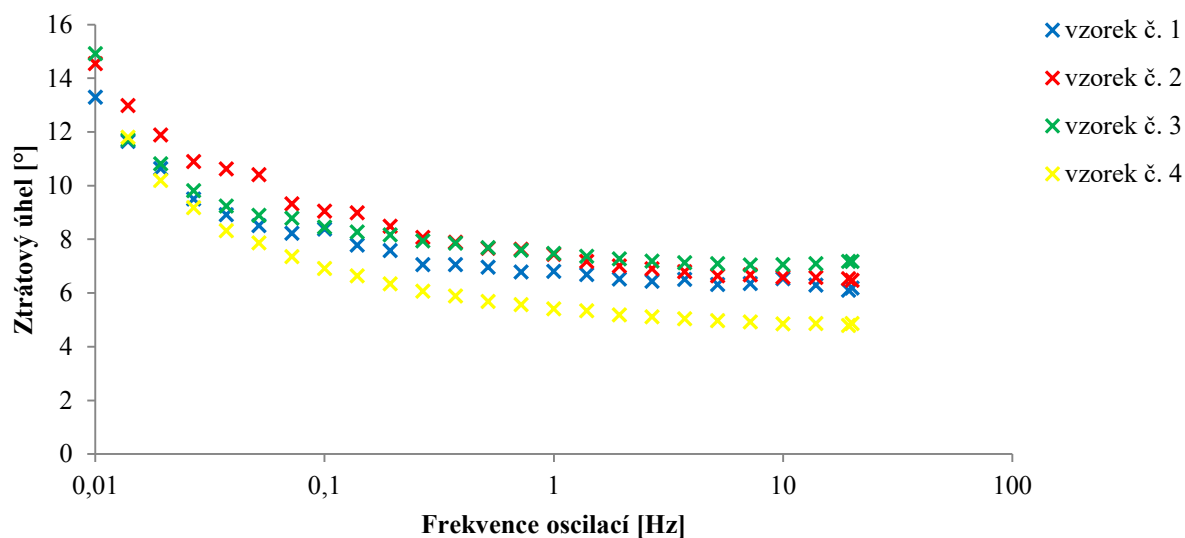
Obrázek 32: Srovnání jednotlivých vzorků o různých koncentracích chitosanu a SDS připravených mokrou cestou odstředěním

Dalším prováděným testem byl test frekvenční („*frequency sweep*“), jelikož byla u všech vzorků zvolena stejná amplituda deformace, mohou být jednotlivá měření porovnávána. Tento druh testu je založen na konstantní amplitudě deformace a měnící se frekvenci oscilací. Obrázek 33 znázorňuje frekvenční test pro čtveřici gelů, koncentrace viz tabulka 4, připravených metodou mokré cesty odstředěním. Z grafu je patrné, že připravené hydrogely disponují plně sesíťovanou strukturou, jelikož elastický modul gelů převyšuje jejich viskózní modul v celém rozsahu měřených frekvencí oscilací. Dále je také patrné, že svými mechanickými vlastnostmi jsou si více podobné dvojice gelů se stejnou koncentrací chitosanu, které jsou si podobné i vizuálně. Tyto gely, o koncentraci chitosanu 1 % hm. (jelikož byl přidáním SDS chitosan naředěn na poloviční koncentraci), disponují přibližně o řád vyššími moduly než gely s nižší koncentrací chitosanu. Z toho vyplývá, že vzorky s nižší koncentrací chitosanu jsou méně rigidní, což svědčí také o nižší rigiditě vazeb a menší odolnosti vůči mechanickým vlivům. V měřeném rozsahu frekvencí oscilací, tedy 0,01 – 20 Hz, se nevyskytuje bod překřížení („*cross-over point*“), který se zřejmě nachází při nižší hodnotě frekvencí oscilací, které ovšem nejsme schopni naměřit pomocí klasické reologie.



Obrázek 33: Frekvenční oscilační testy pro všechny koncentrace vzorků připravených mokrou cestou odstředěním

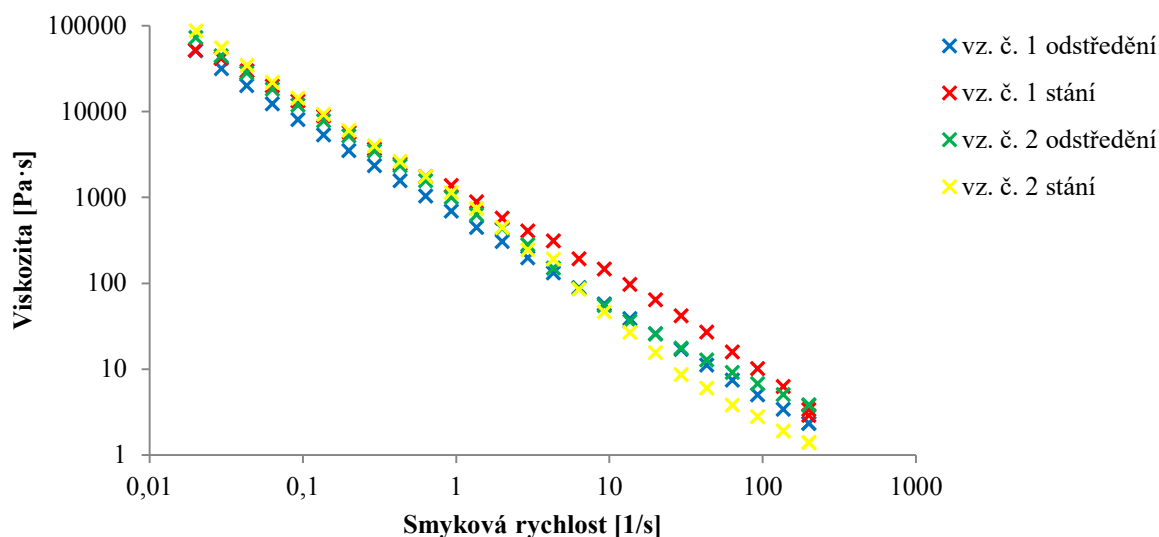
Druhou sledovanou závislostí u frekvenčního testu byla frekvenční závislost ztrátového úhlu. Ztrátový úhel udává míru viskoelasticity vzorku, z jeho definice vyplývá, že hodnota ztrátového úhlu ideálně viskózní látky je rovna 90° , naopak ideálně elastické látky 0° . Pro reálný materiál se tedy hodnota ztrátového úhlu nachází v intervalu $<0^\circ, 90^\circ>$. Ztrátový úhel je definován jakožto poměr modulu viskózního ku modulu elastickému. Z grafu uvedeného na obrázku 34 je patrné, že všechny gely dosahovaly hodnot ztrátového úhlu nižších než 20° . Takto nízké hodnoty ztrátových úhlů znamenají, že se jedná o gely s vysokou rigiditou.



Obrázek 34: Frekvenční závislost ztrátového úhlu pro všechny kombinace vzorků připravených mokrou cestou odstředěním

Třetím reologickým testem byl test tokový, jehož výstupem je graf na obrázku 35 představující závislost smykové rychlosti na dynamické viskozitě. Test byl prováděn v rozpětí

smykových rychlostí $0,02 \text{ s}^{-1}$ až po $200,00 \text{ s}^{-1}$. V grafu jsou srovnávány vzorky č. 1 a 2 připravené jak odstředěním, tak stáním, z čehož je opět patrné, že rozdíly mezi metodou stání a odstředění nejsou pozorovatelné. Naměřené závislosti vykazují téměř stejný klesající trend u všech hydrogelů. Z klesajícího trendu vyplývá, že gely odolávaly mechanickému působení přibližně stejně a taktéž deformace vazeb probíhala postupně.



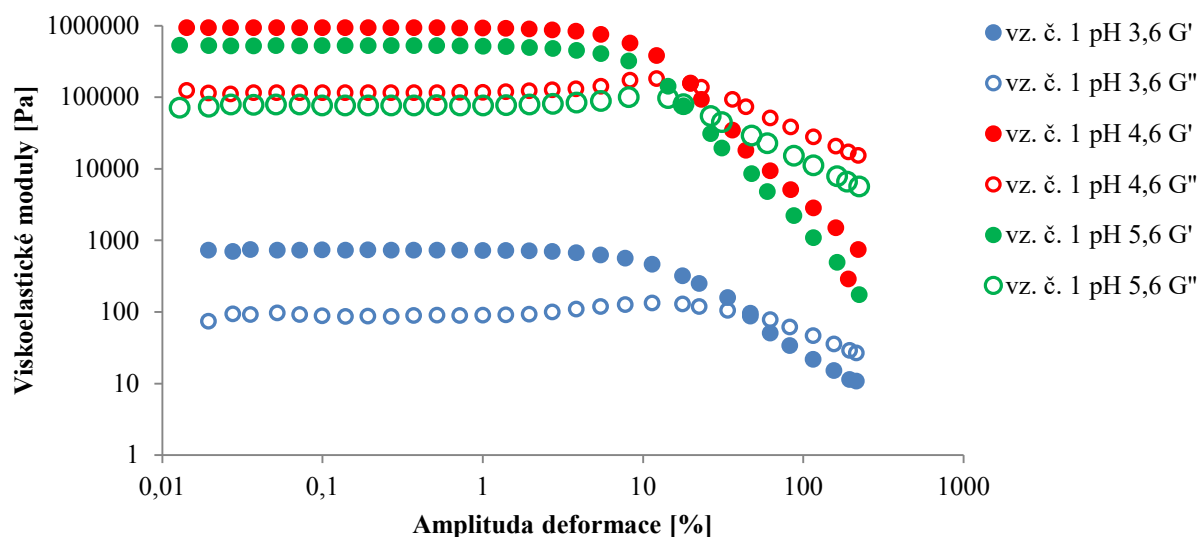
Obrázek 35: Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti u vzorků č. 1 a 2 připravených stáním a odstředěním

Vliv pH a iontové síly na hydrogely chitosan/SDS

Následně byl u hydrogelů chitosan/SDS zkoumán vliv pH a iontové síly pufru, jež se ukázaly jako parametry značně ovlivňující tvorbu gelů. Při nižší hodnotě iontové síly pufru, tedy 10 mM, se nepodařilo připravit žádný gel při zvolených hodnotách pH. Při vyšší iontové síle, tedy 150 mM, se podařilo připravit gely u vzorků č. 1, vytvořeného z 2 % hm. chitosanu a 200 mM SDS, a vzorků č. 3, vytvořeného z 2 % hm. chitosanu a 50 mM SDS, při všech třech hodnotách pH, tedy 3,6; 4,6 a 5,6. Celkem tedy bylo k reologickým měřením použito šest vzorků s upraveným pH a upravenou iontovou silou. U těchto vzorků byl opět proveden test amplitudový, následovaný testem frekvenčním a na závěr testy tokové. Pro každý test byl, stejně jako v předchozích měřeních, použit nový vzorek.

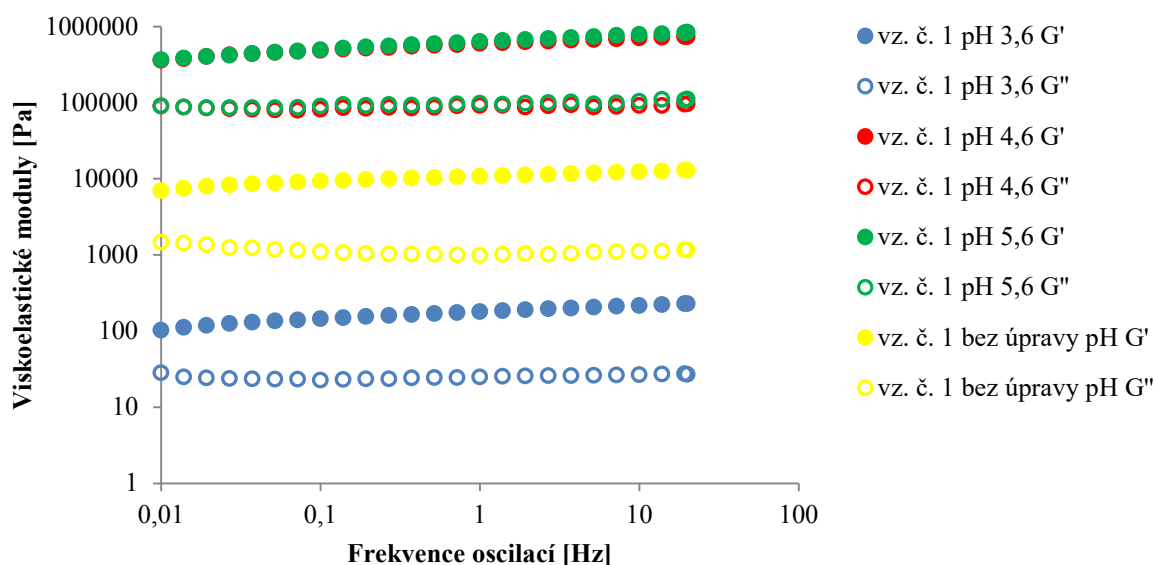
Jako první byl tedy proveden test amplitudový, z jehož výsledků bylo patrné, že se u všech změřených vzorků jedná o gely, jelikož elastický modul G' převyšoval modul viskózní G'' přibližně do hodnoty amplitudy deformace 10 %. Za touto hodnotou již dochází k nevratné deformaci gelu. Na obrázku 36 je znázorněno srovnání všech tří hodnot pH u vzorku č. 1, tedy gelu vzniklého smíšením 200 mM SDS a 2 % hm. chitosanu. Je patrné, že gely připravené při pH 4,6 a 5,6 vykazují téměř totožné mechanické vlastnosti, kdežto gel připravený při pH 3,6 disponuje výrazně nižšími viskoelastickými moduly. Viskoelastické moduly gelu o pH 3,6 odpovídají, viz obrázek 32, modulům gelů chitosan/SDS bez úpravy pH. Stejně jako u gelů chitosan/SDS bez úpravy pH a iontové síly je zde poměrně široká oblast lineární viskoelastivity. Tato oblast je u všech vzorků v rozmezí 0,01 – 10 % amplitudy

deformace. Stejné trendy byly pozorovány i u vzorku č. 3, tedy vzorku vzniklého smíšením 50 mM SDS a 2 % hm. chitosanu. Pro frekvenční test byla opět zvolena hodnota amplituda deformace 1 %. I přestože nám amplitudové testy ukázaly, že se jedná o gely u všech vzorků, z vizuální charakterizace víme, že u vzorků o hodnotách pH 3,6 a 4,6 docházelo ke gelaci pouze na povrchu. Reometr tedy nejprve vytlačil vodu obsaženou uvnitř vzorku a teprve poté změřil samotný gelový obal. Pro možné další použití v oblasti medicínských aplikací je však nezbytně nutné, aby vzorek byl co nejvíce homogenní. Jako ideální se tedy stále jeví vzorky chitosan/SDS při pH 5,6 a iontové síle pufru 150 mM, a to jak č. 1, tak č. 3.



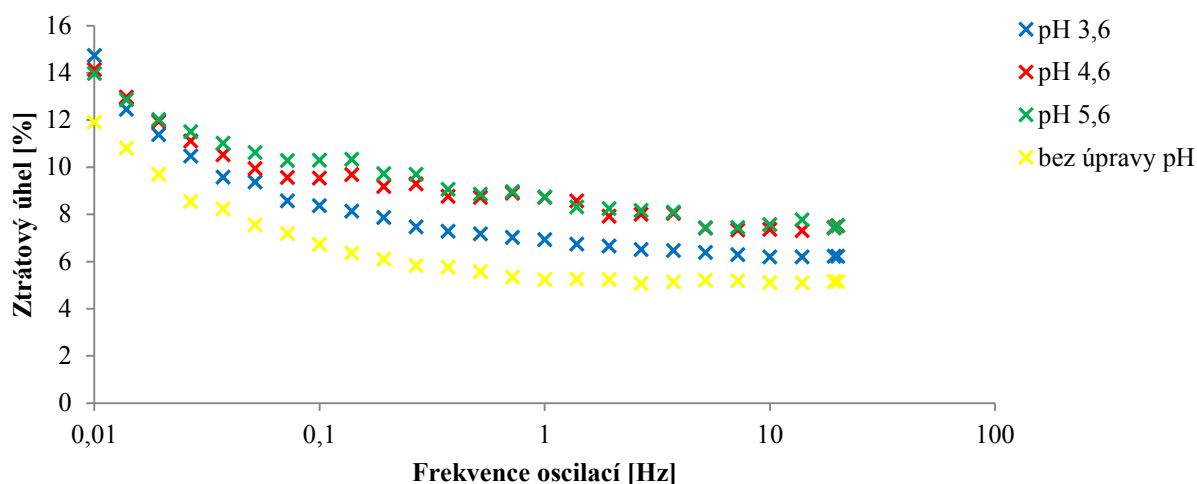
Obrázek 36: Amplitudový test u vzorků č. 1 lišících se hodnotou pH

Druhým reologickým testem byl test frekvenční, který byl proveden v rozsahu frekvencí 0,01 Hz až 20 Hz. Z grafu na obrázku 37 je patrné, že připravené hydrogely disponují plně sesíťovanou strukturou, a to na základě faktu, že elastický modul gelů převyšuje jejich viskózní modul. Dále se opět projevil trend patrný již z amplitudového testu, kdy gely připravené o hodnotách pH 4,6 a 5,6 disponují přibližně o 3 řády vyššími viskoelastickými moduly než gely s pH 3,6. Z toho vyplývá, že vzorky s pH 3,6 jsou méně rigidní, což svědčí také o nižší rigiditě vazeb a menší odolnosti vůči mechanickým vlivům. Gely s hodnotou pH 3,6 dokonce disponují přibližně o řád nižšími moduly než gely bez úpravy pH. V měřeném rozsahu frekvencí oscilací se stejně jako u gelů bez úpravy pH nevyskytuje bod překřížení.



Obrázek 37: Frekvenční test pro vzorky č. 1 lišící se hodnotou pH i bez úpravy pH

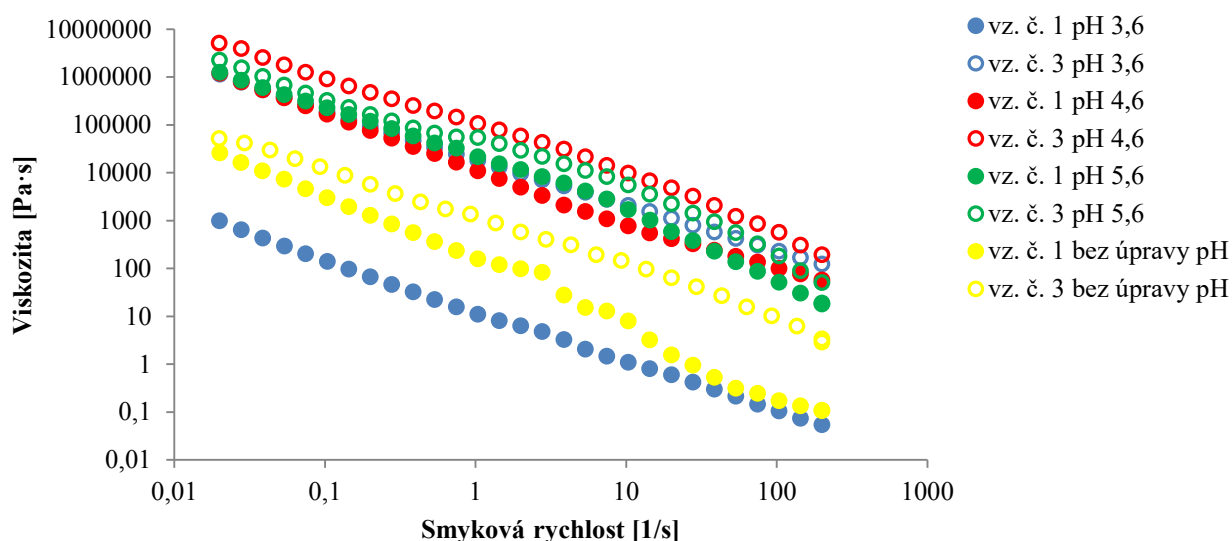
U frekvenčního testu byla rovněž zkoumána frekvenční závislost ztrátového úhlu, jež nám poskytuje informaci o viskoelasticitě vzorků. Tato závislost je znázorněna pro vzorek číslo 1 (vzniklý smíšením 200 mM SDS a 2 % hm. chitosanu) na obrázku 38. Výsledky nám potvrzují, že se jedná o velmi rigidní gely, jelikož hodnota ztrátového úhlu nedosahuje 20 °. Z grafu je patrné, že nejvyšší mírou elasticity disponuje gel bez úpravy pH. Gely o hodnotách pH 4,6 a 5,6 jsou si svým chováním opět velmi podobné.



Obrázek 38: Frekvenční závislost ztrátového úhlu pro vzorky č. 1 s i bez úpravy pH

Posledním reologickým testem byl test tokový, jehož výstupem je graf závislosti smykové rychlosti na dynamické viskozitě znázorněný na obrázku 39. Rozpětí smykových rychlostí bylo zvoleno od $0,02 \text{ s}^{-1}$ až po $200,00 \text{ s}^{-1}$. V grafu jsou srovnávány vzorky č. 1 a 3, tedy vzorky obsahující 1 % hm. chitosanu a 100 mM SDS v případě vzorku č. 1 či 25 mM SDS v případě vzorku č. 3 připravené mokrou cestou stáním. Vzorky se kromě koncentrace SDS liší také hodnotami pH, pro srovnání jsou v grafu znázorněny i gely o stejné koncentraci SDS

a chitosanu ale bez úpravy pH. Naměřené závislosti vykazují téměř stejný klesající trend u všech hydrogelů. Z klesajícího trendu vyplývá, že gely odolávaly mechanickému působení přibližně stejně a také deformace vazeb probíhala postupně.



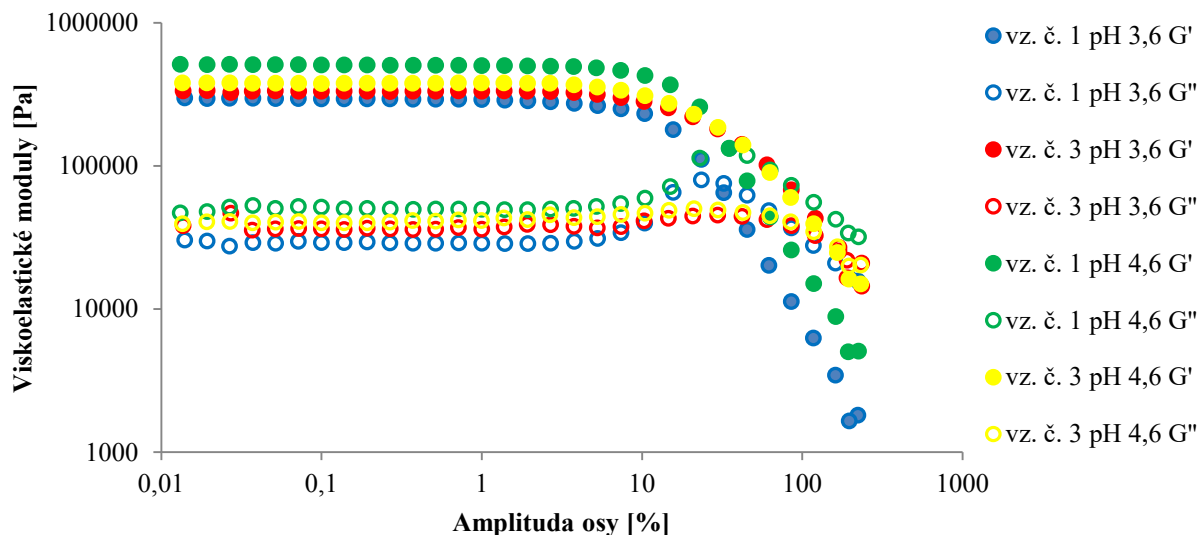
Obrázek 39: Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti u vzorků č. 1 a 3 s i bez úpravy pH

Vliv pH a iontové síly na hydrogely chitosan/STS

Jako další v pořadí byl u hydrogelů chitosan/STS prověřen vliv pH a iontové síly pufru. STS bylo pro toto měření použito ve větvené struktuře známé pod obchodním názvem Niaproof. Byla použita pouze mokrá cesta přípravy, a to stáním. Jelikož se bez úpravy pH gely podařit nepřipravilo, ukázaly se tyto parametry jako parametry značně ovlivňující tvorbu gelů. Při nižší hodnotě iontové síly pufru, tedy 10 mM, se opět nepodařilo připravit žádný gel při zvolených hodnotách pH. Při vyšší iontové síle, tedy 150 mM, se podařilo připravit gely u vzorků č. 1, vytvořeného z 2 % hm. chitosanu a 200 mM STS, a vzorků č. 3, vytvořeného z 2 % hm. chitosanu a 50 mM STS ovšem pouze při hodnotách pH 3,6 a 4,6. Celkem tedy byly k reologickým měřením použity pouze 4 vzorky z připravených 24 vzorků s upraveným pH a upravenou iontovou silou. Avšak ty byly více homogenní než gely chitosan/SDS s pH 3,6 a 4,6. U připravených gelů chitosan/STS docházelo ke gelaci v celém objemu vzorku nikoliv pouze na povrchu a nedocházelo tak k uvolnění vody ze vzorku po sjetí senzoru do měřicí polohy. U těchto vzorků byly opět provedeny jak testy oscilační, tak testy tokové.

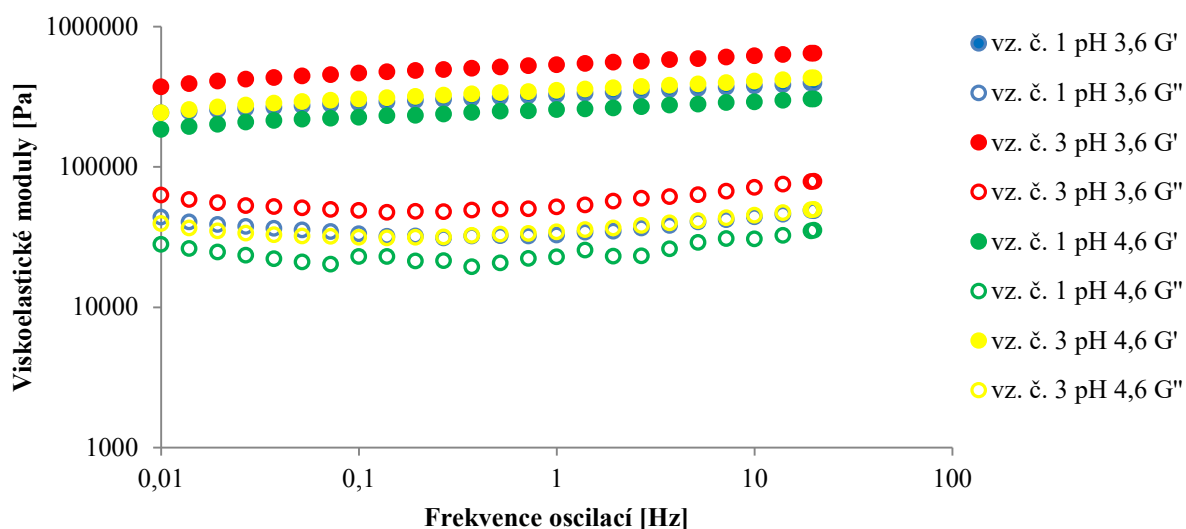
Nejprve byl proveden test amplitudový, z jehož výsledků bylo patrné, že se u všech čtyř vzorků jedná o gely, jelikož elastický modul G' převyšoval modul viskózní G'' . Tento test sloužil primárně ke stanovení amplitudy pro test frekvenční, tato amplituda byla stanovena na základě oblasti lineární viskoelastivity na hodnotu 1 %. Na obrázku 40 je znázorněno srovnání obou hodnot pH u vzorků č. 1, tedy gelu vzniklého z 200 mM STS a 2 % hm. chitosanu a vzorků č. 3 tedy gelu vzniklého z 50 mM STS a 2 % hm. chitosanu. Z grafu je patrné, že všechny připravené gely vykazují téměř totožné mechanické vlastnosti bez ohledu na hodnotu pH či koncentraci STS. Stejně jako u gelů chitosan/SDS je zde poměrně široká oblast lineární viskoelastivity. Gely chitosan/STS disponují velmi

vysokými hodnotami viskoelastických modulů, z gelů chitosan/SDS se jim vyrovnávají pouze gely s hodnotami pH 4,6 a 5,6. Velmi rigidní gely se mohou jevit jako gely ideální, záleží však na konkrétní oblasti potenciální medicínské aplikace, takto rigidní gely nebudou vhodné pro roztírání po pokožce či jako nosič léčiva.



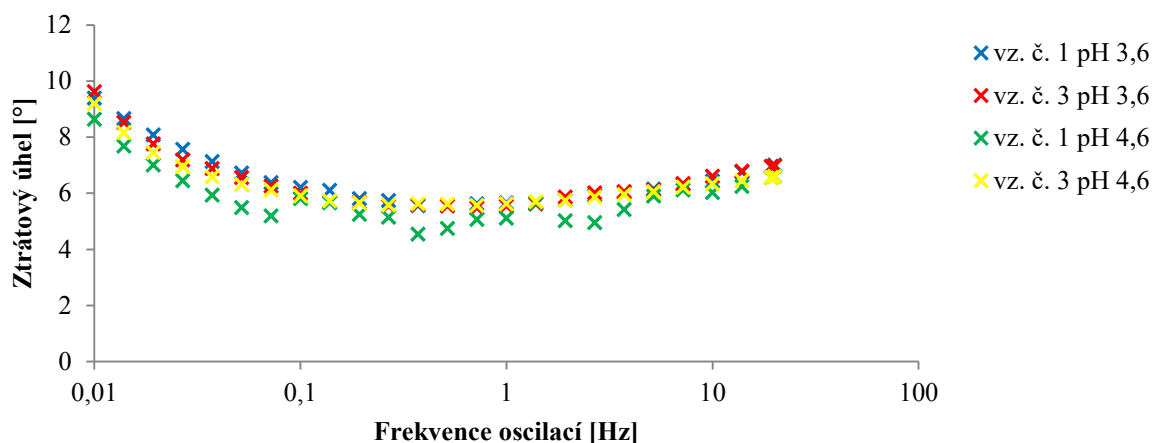
Obrázek 40: Amplitudový oscilační test pro gely chitosan/STS s upraveným pH

Druhým reologickým testem byl test frekvenční, který byl proveden v rozsahu frekvencí 0,01 Hz až 20 Hz s konstantní amplitudou deformace 1 %, aby u měřených gelů docházelo k deformaci elastické, tedy vratné. Z obrázku 41 je patrné, že připravené hydrogely vykazují téměř totožné závislosti. Elastické moduly G' plně převyšovaly moduly viskózní G'' , což svědčí o dokonalé síťové struktuře připravených gelů. Stejně jako u gelů chitosan/SDS se ani zde nevyskytovalo v měřeném rozsahu frekvencí překřížení modulů („*cross point*“). Srovnáme-li naměřené hodnoty s hodnotami frekvenčního testu u gelů chitosan/SDS, jeví se gely chitosan/STS jako rigidnější. Podobných hodnot viskoelastických modulů dosahovaly pouze nejvíce rigidní gely chitosan/SDS, a to vzorky č. 1 jak při pH = 4,6, tak při pH = 5,6.



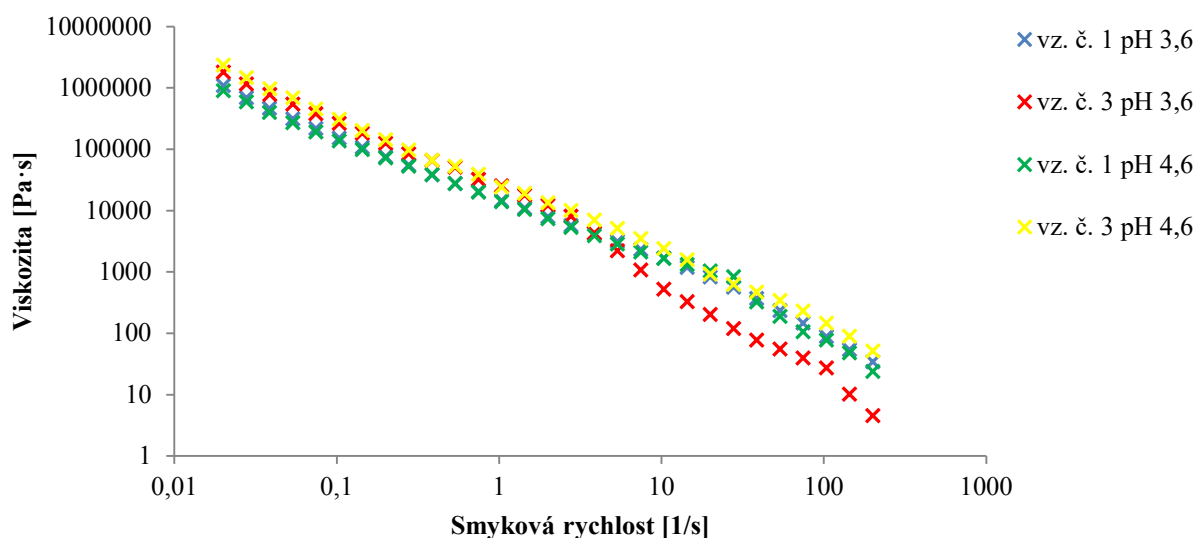
Obrázek 41: Frekvenční oscilační test pro gely chitosan/STS s upraveným pH

Další zkoumanou závislostí u frekvenčního testu byla frekvenční závislost ztrátového úhlu, jež je znázorněna na obrázku 42. Tato závislost je znázorněna pro vzorek číslo 1 (100 mM STS a 1 % hm. chitosan) a vzorek číslo 3 (25 mM STS a 1 % hm. chitosan) s pH upraveným na hodnoty 3,6 a 4,6. Výsledky nám opět potvrzují, že jsou vzorky téměř totožné a že u gelů převažuje elastické chování nad chováním viskózním, jelikož $\delta < 45^\circ$. Dle tohoto měření nemá vliv koncentrace STS ani hodnota pH. Dalším poznatkem potvrzujícím předchozí měření je, že se jedná o velmi rigidní gely, jelikož hodnota ztrátového úhlu nedosahuje 20° . Hodnoty jsou dokonce nižší než u gelů chitosan/SDS.



Obrázek 42: Frekvenční závislost ztrátového úhlu pro gely chitosan/STS s upraveným pH

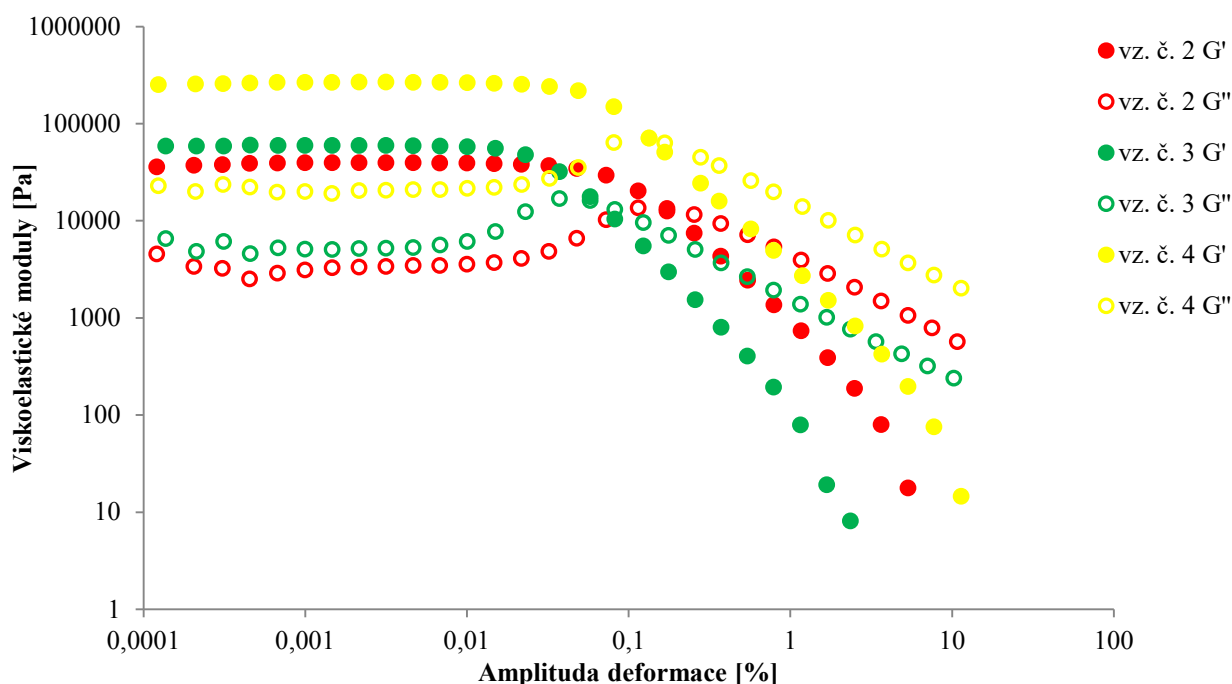
Jako poslední následovaly tokové testy, které byly měřeny v rozmezí smykových rychlostí $0,02 - 200 \text{ s}^{-1}$. Z obrázku 43 je patrné, že všechny vzorky vykazují *nenewtonské* chování, jelikož se gely deformují elasticky. Dále je patrné, že koncentrace tenzidu ani pH viskozitu neovlivňuje. Až na vzorek číslo 3 při pH 3,6 vykazují všechny vzorky téměř stejný pozvolně klesající trend, což znamená, že k deformaci vazeb v gelech docházelo postupně.



Obrázek 43: Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti pro gely chitosan/STS s upraveným pH

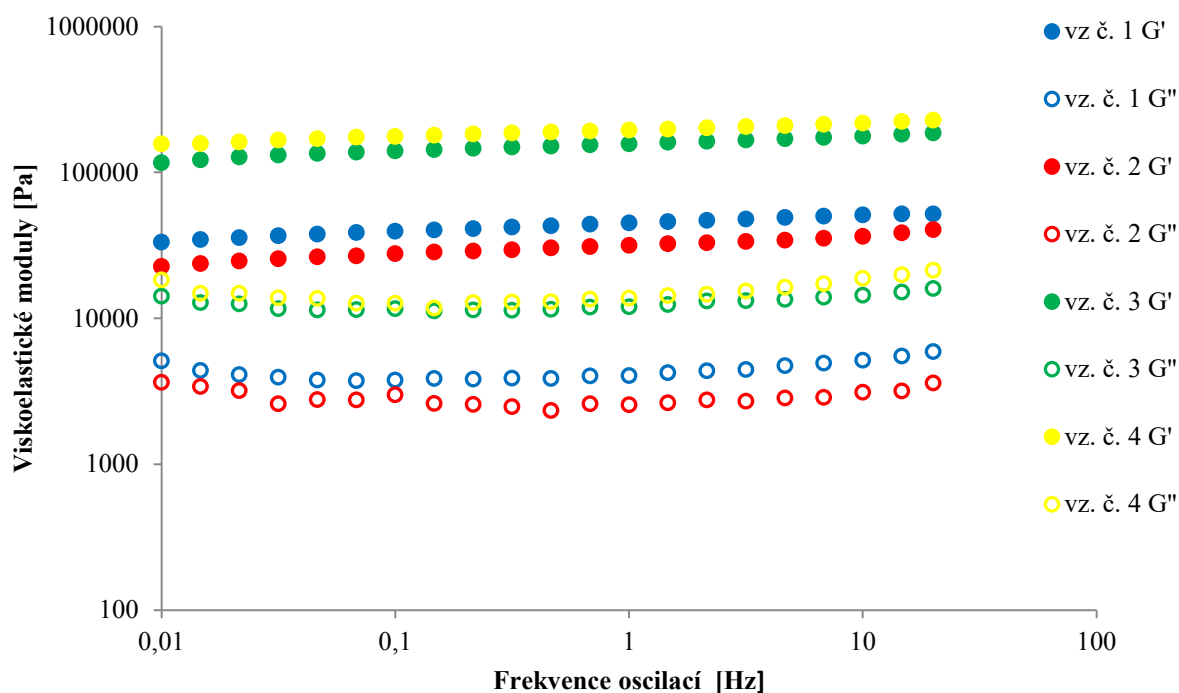
Hydrogely *N,N,N*-trimethylchitosan/SDS a *N,N,N*-trimethylchitosan/STS

Reologickým měřením bylo podrobena všech pět připravených vzorků, viz tabulka 11. Z důvodu menšího množství vzorku byla použita ocelová geometrie typu deska - deska o průměru 8 mm. U připravených vzorků byly provedeny všechny typy testů s nastavením uvedeným v kapitole 5.6. Prvním prováděným testem byl test amplitudový. Na obrázku 44 jsou pro přehlednost uvedeny pouze tři vzorky, a to: vzorek č. 2, tedy vzorek mikrogelů obsahujícího 100 mM STS s větvenou strukturou a 1 % hm. *N,N,N*-trimethylchitosanu, dále vzorek č. 3 obsahující 200 mM SDS a 2 % hm. TMC a vzorek č. 4 obsahující 200 mM STS s lineární strukturou a opět 2 % hm. TMC. U všech pěti připravených vzorků můžeme potvrdit, že se jednalo o gely, jelikož elastický modul G' převyšoval modul viskózní G'' až do hodnoty amplitudy deformace, po jejímž překročení již dochází k nevratné deformaci gelu. Z grafu je patrné, že zvýšením koncentrace tenzidu dochází k navýšení hodnot viskoelastických modulů a vznikají tak rigidnější gely. Oproti gelům chitosan/SDS bez úpravy pH dochází k nárůstu hodnot modulů o téměř dva řády. U gelů chitosan/STS je rigidita takto připravených gelů srovnatelná. Avšak oblast lineární viskoelastivity má u všech připravených TMC gelů menší rozsah (0,0001 % – 0,01 %) než u gelů s nemethylovaným chitosanem, kde LVO oblast končila u hodnoty amplitudy deformace 10 %. Proto také byla pro frekvenční testy zvolena nižší hodnota amplitudy deformace, než tomu bylo u předchozích měření.



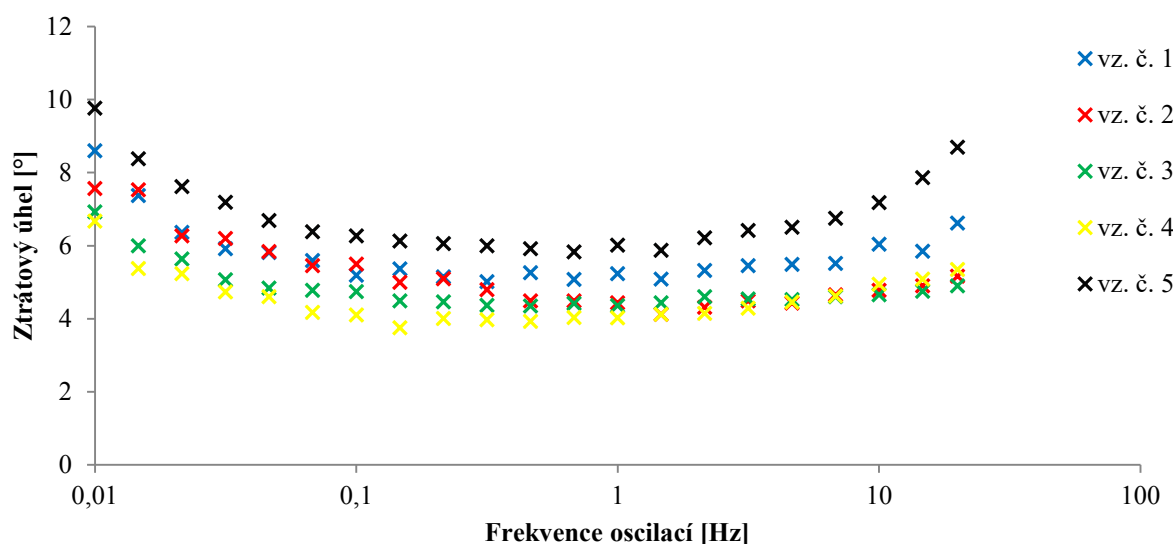
Obrázek 44: Amplitudový test prováděný pro mikrogely TMC/SDS, TMC/STS

Po amplitudovém testu následoval test frekvenční, jehož výstupem byl graf uvedený na obrázku 45. Pro přehlednost jsou na něm uvedeny pouze čtyři vzorky, a to: vzorek číslo 1 obsahující 100 mM SDS a 1 % hm. TMC, vzorek č. 2, tedy vzorek mikrogelu obsahujícího 100 mM STS s větvenou strukturou a 1 % hm. TMC, dále vzorek č. 3 obsahující 200 mM SDS a 2 % hm. TMC a vzorek č. 4 obsahující 200 mM STS s lineární strukturou a 2 % hm. TMC. Na základě faktu, že elastický modul všech vzorků převyšuje jejich viskózní modul, můžeme říci, že připravené hydrogely disponují plně sesíťovanou strukturou. Opět je zde patrný trend, který se vykytoval již u testu amplitudového, kdy vzorky s vyšší koncentrací TMC a tenzidu disponují vyššími viskoelastickými moduly oproti vzorkům s nižší koncentrací TMC a tenzidů. Vzorky s nižší koncentrací TMC a tenzidu jsou tedy méně rigidní, což svědčí také o nižší rigiditě vazeb a menší odolnosti vůči mechanickým vlivům. Srovnáme-li gely chitosan/SDS a TMC/SDS bez úpravy pH z výsledků frekvenčního testu je patrné, že při stejné koncentraci polymeru a tenzidu disponovaly gely podobnými hodnotami viskoelastických modulů, a tedy i podobnou rigiditou. Kdežto srovnáním gelů chitosan/STS a TMC/STS (s úpravou pH, jelikož bez úpravy pH se gely podařit nepodařilo) dosahovaly gely TMC/STS nižší rigidity. V měřeném rozsahu frekvencí oscilací, tedy 0,01 – 20 Hz, se nevyskytuje „*cross-over point*“.



Obrázek 45: Frekvenční test prováděný pro mikrogely TMC/SDS, TMC/STS

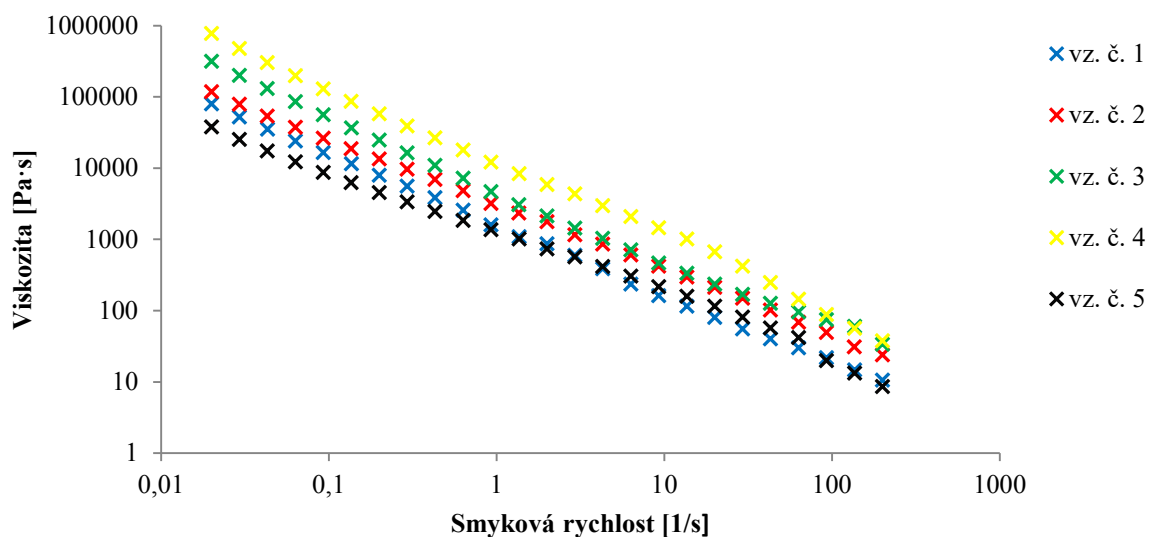
V pořadí druhou sledovanou závislostí u frekvenčního testu byla frekvenční závislost ztrátového úhlu, která je znázorněna na obrázku 46. Z grafu je patrné, že všechny připravené mikrogely, označení vzorků viz tabulka 11, dosahovaly hodnot ztrátového úhlu nižších než 10° . Což představovalo velmi nízké hodnoty, z čehož vyplývá, že se jedná o gely s vysokou rigiditou. U všech vzorků bylo dosaženo nižších hodnot než u hydrogelů připravených z nemethylovaného chitosanu.



Obrázek 46: Frekvenční závislost ztrátového úhlu pro mikrogely TMC/SDS, TMC/STS

Třetím a zároveň posledním prováděným reologickým testem byl test tokový, jehož výstupem je graf na obrázku 47 představující závislost smykové rychlosti na dynamické

viskozitě. V grafu jsou srovnávány všechny vzorky připravených mikrogelů. Závislosti jednotlivých vzorků vykazují téměř stejný klesající trend u všech hydrogelů bez patrných větších rozdílů v použitém tenzidu či koncentraci TMC nebo tenzidu. Z klesajícího trendu vyplývá, že gely odolávaly mechanickému působení přibližně stejně a taktéž deformace vazeb probíhala postupně.



Obrázek 47: Závislost dynamické viskozity na smykové rychlosti pro mikrogely TMC/SDS, TMC/STS

7 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce byla příprava a charakterizace fázově separovaných hydrogelů na bázi kationaktivního polymeru a anionaktivního tenzidu. Na základě literární rešerše byla použita reologie, jakožto stěžejní metoda ke studiu viskoelastických vlastností připravených gelů. Dále byl také zvolen zástupcem kationaktivního polymeru chitosan, jehož nesporné výhody tkví v jeho biokompatibilitě, biodegradabilitě, díky kterým nachází široké uplatnění v mnoha odvětvích. K zástupcům anionaktivních tenzidů patřily dodecylsulfát sodný (SDS) a tetradecylsulfát sodný (STS), jež disponuje biokompatibilitou a je dokonce aktivní složkou léku používaného při léčbě křečových žil. Z rešerše bylo známo, že dvojice chitosan/SDS by měla tvořit gely vcelku bezproblémově, kdežto u dvojice chitosan/STS byla ve většině případů potřeba gelaci podpořit např.: změnou pH, iontové síly či zvýšením teploty.

Tyto fyzikální gely nabízí široké možnosti potenciálního využití. Nejvíce přichází v úvahu uplatnění jakožto biodegradabilní nosiče léčiv. Jejichž signifikantním cílem je pomalé uvolňování účinné složky, zvyšování rozpustnosti a vylepšení možností cíleného podávání. Obrovskou nevýhodou chitosanu v této oblasti využití je jeho nerozpustnost v roztocích s pH 5,6 a vyšším. Proto bylo v této práci rovněž přistoupeno k syntéze derivátu chitosanu rozpustného ve vodním prostředí, konkrétně se jednalo o *N,N,N*-trimethylchitosan. Pomocí metody SEC-MALS byla stanovena molekulová hmotnost jednotlivých chitosanů přítomných na pracovišti Fakulty chemické. Na základě výsledků ze SEC-MALS byl zvolen chitosan s molekulovou hmotností 170 kDa. Syntéza byla uskutečněna pomocí dvoukrokové reakce [32], která probíhala mechanismem nukleofilní substituce, kdy v prvním kroku vznikl *N,N*-dimethylchitosan. Při následné charakterizaci byl také srovnáván vliv lyofilizace na kvalitu výsledného produktu. Část vzorku byla lyofilizována po prvním i po druhém kroku syntézy a druhá část byla lyofilizována pouze po druhém kroku syntézy. Podařilo se nasyntetizovat 0,11 g TMC, který byl lyofilizován mezi prvním a druhým krokem syntézy a 0,12 g TMC, který nebyl lyofilizován mezi prvním a druhým krokem. Vizuálně mezi těmito dvěma vzorky nebyl patrný rozdíl. Naopak u *N,N,N*-trimethylchitosanu byly patrné již vizuální změny oproti nemethylovanému chitosanu. Zatímco nemethylovaný chitosan byl nažloutlé barvy, TMC měl barvu bílou a jeho struktura byla poměrně lepivá, připomínala pavučinu.

Následně tedy bylo přistoupeno k charakterizaci produktu syntézy, která nám měla potvrdit, zda se skutečně strukturně jedná o *N,N,N*-trimethylchitosan. Charakterizace proběhla prostřednictvím následujících čtyř analytických metod: SEC-MALS, elementární analýza, infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací a nukleární magnetická rezonance. U SEC-MALS bylo hlavním ukazatelem správně provedené methylace navýšení molekulové hmotnosti produktu oproti výchozí látce, která měla molekulovou hmotnost 170 kDa. U TMC lyofilizovaného po obou krocích byla výsledná molekulová hmotnost 208 kDa, kdežto u TMC lyofilizovaného pouze po druhém kroku syntézy byla výsledná molekulová hmotnost stanovena pouze na 193 kDa. U obou hodnot molekulových hmotností methylovaných chitosanů je však patrný nárůst molekulové hmotnosti, což potvrdilo správný průběh methylace a také to, že během ní nedošlo ke štěpení makromolekul TMC. Z výsledků je také

patrné, že lyofilizace kladně ovlivňuje průběh methylace. Avšak samotné stanovení molekulové hmotnosti nebylo k charakterizaci dostatečné, proto bylo přistoupeno k dalším metodám. Následně byla provedena elementární analýza, která sledovala procentuální zastoupení jednotlivých biogenních prvků u všech tří vzorků: tedy nemethylovaného chitosanu, TMC lyofilizovaného pouze jednou a TMC lyofilizovaného dvakrát. Zde byl hlavním faktem dokazujícím vznik TMC klesající poměr uhlíku ku vodíku. Víme-li, že methylací je aminoskupina ($-\text{NH}_2$) substituována methylovými skupinami za vzniku amoniové soli ($-\text{N}(\text{CH}_3)_3$), můžeme předpokládat téměř trojnásobný nárůst vodíků oproti nárůstu uhlíků, a tak by měl tento poměr C/H po methylaci klesat. U nemethylovaného chitosanu byla hodnota C/H 5,42, u TMC lyofilizovaného pouze po druhém kroku klesl poměr na 4,77, kdežto u TMC lyofilizovaného po obou krocích klesl poměr pouze na 4,87. Co se týče procentuálního zastoupení jednotlivých prvků, u dusíku je patrný pokles po methylaci, jelikož samotnou methylací k jeho nárůstu nedocházelo a jeho pokles byl na úkor nárůstu procentuálního zastoupení vodíku. U procentuálního zastoupení uhlíku došlo opět k poklesu, avšak menšímu než u dusíku. Třetí analytickou metodou, která nám potvrdila úspěšnou methylaci, byla infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací. U této metody bylo na základě srovnání infračervených spekter jak nemethylovaného chitosanu, kde byly patrné valenční vibrace N-H vazeb v primárních aminech, tak methylovaného chitosanu, kde se projeví valenční vibrace N-H vazeb v sekundárních aminech, potvrzeno, že se jedná o *N,N,N*-trimethylchitosan. Poslední metodou byla nukleární magnetická rezonance, od níž se očekávalo nejen verifikace struktury, ale také stanovení stupně kvarternizace výsledného produktu. Struktura TMC byla ověřena na základě srovnání získaného NMR spektra se spektrem uvedeném ve článku [32], podle kterého syntéza probíhala. Stupeň kvarternizace byl stanoven na 81,7 %, čímž bylo dosaženo hodnoty podobné jako v referenci, kde odpovídala 86 %. Jelikož byl TMC na pracovišti Fakulty chemické syntetizován poprvé, již samotná syntéza představovala úspěšný krok. *N,N,N*-trimethylchitosan tedy byl dostatečně charakterizován a mohlo být přistoupeno ke studiu interakcí s tenzidy.

Jako první byly zkoumány interakce nemethylovaného chitosanu s SDS a STS, posléze bylo přistoupeno k přípravě gelů z TMC a SDS či STS. Všechny vzorky byly připraveny ve „čtveřici“ koncentrací, viz tabulka 4, v 150 mM NaCl, jež představoval fyziologický roztok. Vzorky byly nejprve podrobeny detailní vizuální charakterizaci, posléze následovala stěžejní reologická měření. Mezi zkoumané vlastnosti patřily vzhled, množství a tuhost gelu, či čistota supernatantu. Výsledky pozorování jsou uvedeny v tabulkách v kapitole 6.3.1. Z výsledků pozorování je patrné, že nejvíce gelu u dvojice chitosan/SDS vznikalo u vzorku číslo jedna a tři, tedy vzorku obsahující vyšší koncentraci chitosanu (1 % hm.). Následovala reologická měření, u kterých byla zajímavým faktem poměrně široká oblast lineární viskoelasticity, jež představovala odezvu modulů nezávislou na aplikované amplitudě deformace. Na základě amplitudového testu byla pro test frekvenční zvolena konstantní amplituda deformace 1 %. Hlavním poznatkem testu frekvenčního byl fakt, že gely o koncentraci chitosanu 1 % hm. disponují přibližně o řád vyššími viskoelastickými moduly než gely s nižší koncentrací chitosanu. Z toho vyplývá, že vzorky s nižší koncentrací chitosanu jsou méně rigidní, což svědčí také o nižší rigiditě vazeb a menší odolnosti vůči

mechanickým vlivům. S tenzidem STS se bez úpravy pH a iontové síly nepodařilo připravit gel při žádné ze zvolených koncentrací.

Dále byla také srovnávána metoda přípravy gelu. Byly vyzkoušeny čtyři metody přípravy, a to mokrá cesta stání i odstředění a suchá cesta stání i odstředění. Metodou suché cesty se však bohužel žádný gel připravit nepodařilo, i přesto že bylo do vialek přidáno několik kapek kyseliny octové pro usnadnění rozpustnosti chitosanu. Do budoucna by bylo vhodné metodu přípravy suchou cestou optimalizovat, jelikož se jedná o rychlejší způsob přípravy, u které není potřeba přípravy zásobních roztoků polymeru a tenzidu, čímž se ušetří čas potřebný pro úplné rozpuštění polymeru či tenzidu. Ideální metodou přípravy byla zvolena mokrá cesta stání, jelikož zde bylo dosaženo dokonalé homogenizace systému a rozpuštění vstupních komponent. Mezi metodami stání a odstředění nebyl senzoricky ani reologicky pozorován žádný rozdíl. Tato metoda byla poté používána při přípravě gelů chitosan/SDS a chitosan/STS s úpravou pH a iontové síly a také u přípravy všech gelů, kde jakožto polymer vystupoval TMC. U TMC gelů by jistě bylo zajímavé vyzkoušet také suchou cestu přípravy, kde by rozpustnost TMC neměla přípravu nikterak omezovat, jako tomu bylo u nemethylovaného chitosanu. Bohužel však byla příprava TMC gelů omezena nasyntetizovaným množstvím.

Dalšími zkoumanými parametry byly pH a iontová síla acetátového pufru, ve kterém byly hydrogely připravovány mokrou cestou stáním. Tyto parametry se ukázaly jako parametry významně ovlivňující tvorbu gelu. Acetátový pufr byl zvolen na základě SEC-MALS měření chitosanů, ze kterých bylo známo, že je v tomto pufru chitosan rozpustný a nahradil tak 0,15 M roztok NaCl. Byly zvoleny dvě hodnoty iontové síly pufrů, a to 10 mM a 150 mM, pro každou z těchto hodnot byly připraveny pufrы o pH 3,6; 4,6 a 5,6 pro oba tenzidy. Celkem tedy bylo připraveno 36 vzorků, u kterých se při hodnotě iontové síly 10 mM nepodařilo připravit žádný gel, což znamená, že „koncentrace náboje“ tenzidu a chitosanu nebyla dostatečná. K uskutečnění gelace pomocí fázové separace tedy byla nutná vyšší hodnota iontové síly (150 mM). U vzorků, kde byl jako tenzid použit SDS rozpuštěný v pufru o iontové síle 150 mM vznikaly gely pouze u vzorků číslo 1 a 3, viz tabulka 4, tedy těch obsahujících 1 % hm. chitosanu. Avšak ideálního gelu u vzorků s pH 3,6 a 4,6 dosaženo nebylo, jelikož ke gelaci docházelo pouze na povrchu nikoliv uvnitř, kde byly vzorky vyplněny vodou. U reologických měření docházelo k uvolnění vody z vnitřní části vzorku poté, co se senzor dostal do měřicí polohy. Měřen byl tedy jen gelový obal. Za ideální gel však můžeme na základě senzorické analýzy považovat gel vytvořený při nejvyšší hodnotě pH, tedy 5,6, a vyšší hodnotě iontové síly pufru, tedy 150 mM, ale opět pouze u vzorků číslo 1 a 3, tedy těch obsahujících 1 % hm. chitosanu. U těchto gelů docházelo ke gelaci v celém objemu, supernatant se nevytvořil téměř žádný a byl transparentní. Gely byly rigidní, vrypem se netáhly. Z reologických měření vyplynulo, že gely připravené při pH 4,6 a 5,6 vykazovaly, na základě amplitudového testu, téměř totožné mechanické vlastnosti, kdežto gel připravený při pH 3,6 disponoval výrazně nižšími viskoelastickými moduly. Viskoelastické moduly gelu o pH 3,6 odpovídaly modulům gelů chitosan/SDS bez úpravy pH. Stejně jako u gelů chitosan/SDS bez úpravy pH a iontové síly zde byla poměrně široká oblast lineární viskoelastivity. U frekvenčního testu se opět projevil trend

patrný již z amplitudového testu, kdy gely připravené o hodnotách pH 4,6 a 5,6 disponovaly přibližně o 3 řády vyššími viskoelastickými moduly než gely s pH 3,6. Z čehož můžeme učinit závěr, že vzorky s pH 3,6 byly méně rigidní a dokonce disponovaly přibližně o řád nižšími moduly než gely bez úpravy pH. Za ideální gel byly tedy v případě použití SDS zvoleny vzorky číslo 1 a 3 s vyšší koncentrací chitosanu při pH 5,6 a vyšší iontové síle 150 mM. Jelikož se jedná o vysoce rigidní gel, nebude moci být použit například pro rozetření po pokožce a jeho použití tedy bude omezené.

Naopak u vzorků, kde byl jako tenzid použit STS se při pH 5,6 a vyšší iontové síle pufru gely připravit nepodařilo. V pufrech o hodnotě iontové síly 10 mM se stejně jako u SDS žádný gel opět nepodařilo připravit. Ideálních gelů bylo dosaženo u vzorků s vyšší iontovou silou a s vyšším obsahem chitosanu, tedy č. 1 a 3 při pH 3,6 a 4,6. Ke tvorbě gelů také přispělo zvýšení teploty, ve které byly gely ponechány ke stání, na 40 °C. Výsledky vizuálních pozorování jsou přehledně shrnuty do tabulek umístěných v kapitole 6.3.1. Všechny připravené gely vykazovaly téměř totožné mechanické vlastnosti bez ohledu na hodnotu pH či koncentraci STS. Stejně jako u gelů chitosan/SDS zde byla poměrně široká oblast lineární viskoelastivity. Gely chitosan/STS však disponovaly velmi vysokými hodnotami viskoelastických modulů, z gelů chitosan/SDS se jim vyrovnávaly pouze gely s hodnotami pH 4,6 a 5,6. Na základě porovnání naměřených hodnot s hodnotami frekvenčního testu u gelů chitosan/SDS lze konstatovat, že se jevily gely chitosan/STS se vyznačují jakožto více rigidní, což potvrzovaly i hodnoty ztrátových úhlů. Dle tokových testů vzorky vykazovaly *newtonské* chování, jelikož se gely deformovaly elasticky. Ideálními gely tedy byly v případě dvojice chitosan/STS zvoleny vzorky číslo 1 i 3 při pH 3,6 a 4,6 a vyšší iontové síle 150 mM.

Z *N,N,N*-trimethylchitosanu bylo připraveno celkem pět vzorků, koncentrace TMC a tenzidů jsou uvedeny v tabulce 11, které byly připraveny rozpuštěním v 0,15 M NaCl. Příprava byla omezena množstvím nasyntetizovaného TMC, takže nebylo možné prověřit vliv pH či iontové síly, stejně jako nebylo možné vyzkoušet suchou cestu přípravy, jak již bylo zmíněno dříve. Na základě pilotních výsledků získaných při řešení této diplomové práce by bylo vhodné v budoucích experimentech tyto parametry prověřit. Bohužel se ani v jednom případě nepodařilo vytvořit ideální gel, ve všech vialkách docházelo pouze ke tvorbě tzv. mikrogelů usazených na stěnách vialek. Bylo však patrné, že s narůstající koncentrací TMC narůstalo i množství mikrogelu a zvyšovala se i rigidita gelů, což bylo stanoveno na základě reologických měření. Do budoucna by bylo vhodné metodu přípravy optimalizovat tak, aby vznikaly kompaktní gely nikoliv pouze mikrogely. STS bylo použito jak s lineární, tak s větvenou strukturou. Komparací vzorků o stejné koncentraci STS i chitosanu lišících se pouze strukturou STS bylo patrné, že většího množství mikrogelu tvořily vzorky s lineární strukturou STS. U gelů chitosan/SDS a TMC/SDS bez úpravy pH bylo z výsledků frekvenčního testu patrné, že při stejné koncentraci polymeru a tenzidu disponovaly gely podobnými hodnotami viskoelastických modulů a tedy i podobnou rigiditou. Kdežto srovnáním gelů chitosan/STS a TMC/STS (s úpravou pH, jelikož bez úpravy pH se gely podařit nepodařilo) dosahovaly gely TMC/STS nižší rigidity. U všech vzorků bylo dosaženo nižších hodnot ztrátových úhlů než u hydrogelů připravených z nemethylovaného chitosanu.

Tato práce zkoumala základní charakteristiky přípravy hydrogelů na bázi kationaktivního polymeru a anionaktivního tenzidu. Inovačně zde mimo chitosanu byl použit také *N,N,N*-trimethylchitosan. Jehož syntéza a příprava gelů na bázi elektrostatického působení tenzidu a polymeru je prvním krokem vedoucím k celé řadě dalších experimentů, jejichž hlavním cílem bude optimalizace přípravy těchto hydrogelů. Tyto hydrogely by posléze mohly nacházet uplatnění jakožto nosiče léčiv či v jiných medicínských aplikacích.

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. 244 s. ISBN: 80-708-0579-X.
2. DAUTZENBERG, H. *Polyelectrolytes: Formation, Characterization and Application*. Munich: Hanser Publishers, 1994. 343 s. ISBN: 15-699-0127-9.
3. KHOR, Eugene. Chitin: a biomaterial in waiting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2002, roč. 6, č. 4, s. 313-317. DOI: 10.1016/S1359-0286(02)00002-5.
4. SYNOWIECKI, Józef a Nadia Ali AL-KHATEEB. Production, Properties, and Some New Applications of Chitin and Its Derivatives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2010, roč. 2, č. 43, s. 145171. DOI: 10.1080/10408690390826473.
5. PERIAYAH, Mercy Halleluyah, Ahmad Sukari HALIM a Arman Zaharil Mat SAAD. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacognosy Reviews*, 2016, roč. 10, č. 19, s. 39-42. DOI: 10.4103/0973-7847.176545.
6. VAVŘÍKOVÁ, Eva a Jarmila VINŠOVÁ. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chemické listy*. 2009, č. 103, s. 56-65.
7. *Cell cultivation in chitosan alginate hydrogel beads*. 2011. United States. US 8883733 B2. Uděleno 11. 11. 2014. Zapsáno 11. 2. 2011.
8. FRANCO, Telma T. a Martin G. PETER. Advances in chitin and chitosan research. *Polymer International*, 2011, roč. 60, č. 6, s. 873-874. DOI: 10.1002/pi.3111.
9. NIROOMAND, Farzam, Amir KHOSRAVANI a Habibollah YOUNESI. Fabrication and properties of cellulose-nanochitosan biocomposite film using ionic liquid. *Cellulose*, 2016, roč. 23, č. 2, s. 1311-1324. DOI: 10.1007/s10570-016-0872-7.
10. UBHAYASEKERA, Wimal, Amir KHOSRAVANI a Habibollah YOUNESI. Structure and function of chitinases from glycoside hydrolase family 19. *Polymer International*, 2011, roč. 60, č. 6, s. 890-896. DOI: 10.1002/pi.3028.
11. RAMOS-DE-LA-PEÑA, Ana M., Adriana M. RANGEL-RODRÍGUEZ, Mayela R. CASAS-GONZÁLEZ, Nagamani BALAGURUSAMY, J. Adriana SAÑUDO-BARAJAS, Amanda CARRILLO-CASTILLO a Juan Carlos CONTRERAS-ESQUIVEL. Analysis of polyelectrolyte complexes formed with jicama pectic polysaccharide and water-soluble chitosan. *Polymer International*, 2011, roč. 60, č. 6, s. 916-919. DOI: 10.1002/pi.3080.
12. FU, Chun-Chong, Tien-Chieh HUNG, Chia-Hung SU, Devi SURYANI, Wen-Teng WU, Wei-Chen DAI a Yea-Tyam YEH. Immobilization of calcium oxide onto chitosan beads as a heterogeneous catalyst for biodiesel production. *Polymer International*, 2011, roč. 60, č. 6, s. 957-962. DOI: 10.1002/pi.3031.

13. TENG, Wee Lin, Eugene KHOR, Teck Koon TAN, Lee Yong LIM a Su Ching TAN. Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*, 2001, roč. 32, č. 3, s. 305-316.
14. RAVI KUMAR, Majeti N. V. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 2000, roč. 46, č. 1, s. 1-27. DOI: 10.1016/S1381-5148(00)00038-9.
15. PHUVASATE, Sureerat a Yi-Cheng SU. Comparison of Lactic Acid Bacteria Fermentation with Acid Treatments for Chitosan Production from Shrimp Waste. *Journal of Aquatic Food Products Technology*, 2010, roč. 19, č. 3-4, s. 170-179. DOI: 10.1080/10498850.2010.504324.
16. DODANE, Valérie, Vinod D. VILIVALAM, Edelio TABOADA a Marguerite RINAUDO. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharmaceutical Science*, 1998, roč. 6, č. 1, s. 246-253. DOI: 10.1016/S1461-5347(98)00059-5.
17. LIU, Hui, Yumin DU, Xiaohui WANG a Liping SUN. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, roč. 95, č. 2, s. 147-155. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.022.
18. YANG, Dongzhi, Shuang GUO, Jing QIAO a Jun NIE. Investigation on the preparation and application of chitosan/alginate microcapsules. *Journal of Controlled Release*, 2001, roč. 52, č. 1, s. 71-72. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.08.130.
19. ZHENG, Yong, Ying YI, Yipeng QI, Yuting WANG, Weian ZHANG a Ming DU. Preparation of chitosan–copper complexes and their antitumor activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, roč. 16, č. 15, s. 4127-4129. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.04.077.
20. KUMAR, P. T. Sudheesh, N. Mincy RAJ, G. PRAVEEN, et al. In Vitro and In Vivo Evaluation of Microporous Chitosan Hydrogel/Nanofibrin Composite Bandage for Skin Tissue Regeneration. *Tissue Engineering: Part A*, 2013, roč. 19, č. 3-4, s. 380-392. DOI: 10.1089/ten.tea.2012.0376.
21. TCHEMTCHOUA, Victor T., Ganka ATANASOVA, Abdel AQIL, et al. Development of a Chitosan Nanofibrillar Scaffold for Skin Repair and Regeneration. *Biomacromolecules*, 2011, roč. 12, č. 9, s. 3194-3204. DOI: 10.1021/bm200680q.
22. BEHL, Gautam, Javed IQBAL, Niall J. O'REILLY, et al. Synthesis and Characterization of Poly(2-hydroxyethylmethacrylate) Contact Lenses Containing Chitosan Nanoparticles as an Ocular Delivery System for Dexamethasone Sodium Phosphate. *Pharmaceutical Research*, 2016, roč. 33, č. 7, s. 1638-1648. DOI: 10.1007/s11095-016-1903-7.
23. DUTTA, Pradip Kumar; DUTTA, Joydeep; TRIPATHI, V. S. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 2004, roč. 63, č. 1, s. 20-31.

24. MOURYA, V. K. a Nazma N. INAMDAR. Trimethylchitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2009, roč. 20, č. 5, s. 1057-1079. DOI: 10.1007/s10856-008-3659-z.
25. *Patent images* [online]. [cit. 2016-09-23]. Dostupné z: <http://patentimages.storage.googleapis.com/US8287905B1/US08287905-20121016-C00002.png>
26. RÚNARSSON, Ögmundur Vidar, Jukka HOLAPPA, Tapio NEVALAINEN, et al. Antibacterial activity of methylated chitosan and chitooligomer derivatives: Synthesis and structure activity relationships. *European Polymer Journal*, 2007, roč. 43, č. 6, s. 2660-2671. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.03.046.
27. JINTAPATTANAKIT, Anchalee, Shirui MAO, Thomas KISSEL a Varaporn Buraphacheep JUNYAPRASERT. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, roč. 70, č. 2, s. 563-571. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.06.002.
28. KOTZÉ, A. F., B. J. DE LEEUW, H. L. LUEBEN, A. G. DE BOER, J. C. VERHOEF a H. E. JUNGINGER. Chitosans for enhanced delivery of therapeutic peptides across intestinal epithelia: in vitro evaluation in Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997, roč. 59, č. 2, s. 243-253. DOI: 10.1016/S0378-5173(97)00287-1.
29. MI, Fwu-Long, Yong-Yi WU, Yu-Hsin LIN, Kiran SONAJE, Yi-Cheng HO, Chiung-Tong CHEN, Jyuhn-Huang JUANG a Hsing-Wen SUNG. Oral Delivery of Peptide Drugs Using Nanoparticles Self-Assembled by Poly(γ -glutamic acid) and a Chitosan Derivative Functionalized by Trimethylation. *Bioconjugate Chemistry*, 2008, roč. 19, č. 6, s. 1248-1255. DOI: 10.1021/bc800076n.
30. AMIDI, Maryam, Hubert C. PELLIKAAN, Anne H. DE BOER, Daan J. A. CROMMELIN, Wim E. HENNINK a Wim JISKOOT. Preparation and physicochemical characterization of supercritically dried insulin-loaded microparticles for pulmonary delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2008, roč. 68, č. 2, s. 191-200. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.05.007.
31. POLNOK, Assadang, J. Coos VERHOEF, Gerrit BORCHARD, Narong SARISUTA a Hans E. JUNGINGER. In vitro evaluation of intestinal absorption of desmopressin using drug-delivery systems based on superporous hydrogels. *International Journal of Pharmaceutics*, 2004, roč. 69, č. 2, s. 303-310. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.09.022.
32. VERHEUL, Rolf J., Maryam AMIDI, Steffen VAN DER WAL, Elly VAN RIET, Wim JISKOOT a Wim E. HENNINK. Synthesis, characterization and in vitro biological properties of O-methyl free *N,N,N*-trimethylated chitosan. *Biomaterials*, 2008, roč. 29, č. 27, s. 3642-3649. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.05.026.
33. ŠMIDRKAL, J. Tenzidy a detergenty dnes. *Chem. Listy* 93, 1999, s. 421-427.

34. ZÁRUBA L., DORNÍKOVÁ G., ŠKODA J. *Tenzidy?Tenzidy! (modifikace léčebné vložky a výplachu v endodoncii)*, [online]. 2007, [citováno: 2016-10-29]. Dostupné online: www.ladislavzaruba.eu/files/tenzidy.pdf
35. *Dispersing process*. [online], [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://www.inkline.gr/inkjet/newtech/tech/dispersion/>.
36. *Sigma-Aldrich* [online]. [cit. 2016-10-29]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/sodiumdodecylsulfate2883815121311?lang=en>.
37. US Food and Drug Administration: *Soltradecol*. [online]. [cit. 2017-02-18]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/EnforcementActivitiesbyFDA/WarningLettersandNoticeofViolationLetterstoPharmaceuticalCompanies/ucm054378.pdf>
38. STRNADOVÁ, H., KVÍTEK, L. Vliv pufru na tvorbu micel vybraných povrchově aktivních látek. *Chemické listy*, 2009, s. 315–319.
39. KVÍTEK, L., PANÁČEK, A. *Základy koloidní chemie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2007. 52 s. ISBN: 978-80-244-1669-4
40. SALANGER, J-L. *Surfactants: Types and Uses*. Mérida. Venezuela, Universidad de Los Andes. 49 s. 2002.
41. Surfactant micelle characterization using dynamic light scattering. Malvern.com [online], 2006 [cit. 11.11.2016], <http://quimica.udea.edu.co/~coloides/Anexo1.pdf>.
42. HOLMBERG, T., B. JÖNSSON, B. KRONBERG, B. LINDMAN. *Surfactants and Polymers in Aqueous Solution*. 2. vyd. Wiley. 562 s. 2002. ISBN: 0-471-49883-1.
43. ATKINS, P., J. de PAULA. *Atkins' physical chemistry*. 7. vyd., Oxford University Press, 2002. 755 s. ISBN: 0-19-879285-9.
44. MAIBAUM, Lutz, Aaron R. DINNER a David CHANDLER. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, roč. 108, č. 4, s. 6778-6781. DOI: 10.1021/jp037487t
45. BLAŽEJ A. a kol.: *Tenzidy*. Alfa, Bratislava 1977.
46. BOGNOLO, G., Aaron R. DINNER a David CHANDLER. The use of surface-active agents in the preparation and assembly of quantum-sized nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2003, roč. 106, č. 1, s. 169-181. DOI: 10.1016/j.cis.2003.07.002.
47. NAGARAJAN, R., KALPAKCI, B. Viscometric investigation of complexes between polyethylene oxide and surfactant micelles. *Microdomains in Polymer Solutions*, 1985, roč. 30, č. 4, s. 369–381.
48. CHATTERJEE, Sudipta, Tania CHATTERJEE a Seung H. WOO. A new type of chitosan hydrogel sorbent generated by anionic surfactant gelation. *Bioresource Technology*, 2010, roč. 101, č. 11, s. 3853-3858. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.12.089.

49. SUNINTABOON, Panya, Kunyaporn PUMDUANG, Thammasit VONGSETSKUL, Prapadsorn PITTAYANURAK, Natthinee ANANTACHOKE, Patoomratana TUCHINDA a Alain DURAND. One-step preparation of chitosan/sodium dodecyl sulfate-stabilized oil-in-water emulsion of Zingiber cassumunar Roxb. oil extract. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2012, vyd. 414, s. 151-159. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2012.07.031.
50. GEETHA, G. C. SURESH KUMAR a N. DEVANNA. Characterization of Molecular interactions between Chitosan and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). *International Journal of Science & Technology*, 2012, roč. 2, s. 8-15.
51. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3.vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2008. 204 s. ISBN: 978-80-7080-674-6.
52. KLOUDA, Pavel. *Fyzikální chemie*, 2. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2002. 139 s. ISBN: 80-86369-06-4.
53. H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *InTech*, 2011. DOI: 10.5772/24553.
54. PARK, K., SHALABY, W. S., PARK, H. *Biodegradable hydrogels for drug delivery*, Lancaster, PA: TechnomicPub., 1993. 252 s. ISBN: 15-667-6004-6.
55. OKAY, O. a Nadia Ali AL-KHATEEB. General Properties of Hydrogels. *Chemical Sensors and Biosensors*. 2009, roč. 6, s. 1-14. DOI: 10.1007/978-3-540-75645-3_1.
56. CATTANI, I., H. ZHANG, G. M. BEONE, A. A. M. DEL RE, R. BOCCELLI a M. TREVISAN. The Role of Natural Purified Humic Acids in Modifying Mercury Accessibility in Water and Soil. *Journal of Environment Quality*, 2009, roč. 38, č. 2, s. 493-501. DOI: 10.2134/jeq2008.0175.
57. SCHÜTZ, Catherine A., Lucienne JULLERAT-JEANNERET, Peter KÄUPER a Christine WANDREY. Cell Response to the Exposure to Chitosan-TPP/Alginate Nanogels. *Biomacromolecules*, 2011, roč. 12, č. 11, s. 4153-4161. DOI: 10.1021/bm201231x.
58. BRUSSOCK, Susan M. a Thomas C. CURRIER. Use of Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis To Quantify Bacillus thuringiensis δ -Endotoxins. *ACS Symposium series - American Chemical Society*, 1990, č. 432, s. 78-87. DOI: 10.1021/bk-1990-0432.ch009.
59. GENTILINI, Roberta, Sabrina BOZZINI, Fabiola MUNARIN, Paola PETRINI, Livia VISAI a Maria Cristina TANZI. Pectins from Aloe Vera: Extraction and production of gels for regenerative medicine. *Journal of Applied Polymer Science*, 2014, roč. 131, č. 2. DOI: 10.1002/app.39760.
60. Photonics: Water lens with adjustable focus. *Nature*, 2015, roč. 18, č. 7540, s. 458-458. DOI: 10.1038/518458b.

61. SCHRAMM, G. A. *Practical Approach to Rheology and Rheometry*. Německo: Gebrueder GmbH. 1994, 290 s.
62. HOFMANN, J., URBANOVÁ, M. *Fyzika I*. 1. vyd.. Praha: VŠCHT Praha, 2005. 327 s. ISBN: 978- 80-7080-777-4.
63. WEIN, O. *Úvod do reologie*. 1. vyd., Brno: Malé centrum, 1996.
64. VONDRÁČEK, P. a kol. *Metody studia a charakterizace struktury polymerů*. VŠCHT, Praha, 1991.
65. *Guide to rheology*. [online]. [cit. 2016-12-23]. Dostupné z: <http://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm>
66. CHEN, D. T. N., WEN, Q., JANMEY, P. A., CROCKER, J. C., YODH, A. G. Rheology of Soft Materials. *Matter Physics*, 2010, vyd. 1, s. 301–320.
67. MEZGER, T. G. The Rheology Handbook: for users of rotational and oscillatory rheometers. 3. vyd. Hanover [Německo]: Vincentz Network, 2011. ISBN: 978-3-86630-864-0.
68. Measurement apparatus: Rotational methods, [online], [cit. 23. 12. 2016], <http://ciks.cbt.nist.gov/~garbocz/SP946/node14.htm>.
69. PAL, Anjali, Satyajit PAN a Sandip SAHA. Synergistically improved adsorption of anionic surfactant and crystal violet on chitosan hydrogel beads. *Chemical Engineering Journal*. 2013, roč. 17, s. 426-434. DOI: 10.1016/j.cej.2012.11.120.
70. TIKEKAR, Rohan V., Andrew JOHNSON a N. NITIN. Real-time measurement of oxygen transport across an oil–water emulsion interface. *Journal of Food Engineering*. 2011, roč. 103, č. 1, s. 14-20. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.08.030.
71. ONESIPPE, Cristel a Serge LAGERGE. Study of the complex formation between sodium dodecyl sulfate and hydrophobically modified chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 2008, roč. 74, č. 3, s. 648-658. DOI: 10.1016/j.carbpol.2008.04.021.
72. VARAPRASAD, K., N. Narayana REDDY, N. Mithil KUMAR, K. VIMALA, S. RAVINDRA a K. Mohana RAJU. Poly(acrylamide-chitosan) Hydrogels: Interaction with Surfactants. *International Journal of Polymeric Materials*, 2010, roč. 59, č. 12, s. 981-993. DOI: 10.1080/00914037.2010.504147.
73. FATIMI, Ahmed, Pascal CHABROT a Saoussen BERRAHMOUNE. A new injectable radiopaque chitosan-based sclerosing embolizing hydrogel for endovascular therapies. *Acta Biomaterialia*, 2012, roč. 8, č. 7, s. 2712-2721.
74. CHENITE, A., C. CHAPUT a D. WANG. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 2000, roč. 21, č. 21, s. 2155-2161.
75. YOUNG, Jenn-Jong, Cheng-cheung CHEN a Ying-chuan CHEN. Positively and negatively surface-charged chondroitin sulfate-trimethylchitosan nanoparticles as protein carriers. *Carbohydrate Polymers*, 2015, č. 137, s. 532-540.

76. SIEVAL, A. B. Preparation and NMR characterization of highly substituted *N*-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, 1998, roč. 2, č. 36, s. 157-165.
77. PALIWAL, Rishi, Shivani R. PALIWAL, Govind P. AGRAWAL a Suresh P. VYAS. Chitosan nanoconstructs for improved oral delivery of low molecular weight heparin: In vitro and in vivo evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 2012, roč. 22, č. 1-2, s. 179-184. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.10.048.
78. MARTINS, Alessandro F., Pedro V. A. BUENO a Elizângela A. M. S. ALMEIDA. Characterization of *N*-trimethylchitosan/alginate complexes and curcumin release. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2014, č. 57, s. 174-184.
79. AMIDI, Maryam, Stefan G. ROMEIJN, J. Coos VERHOEF, Hans E. JUNGINGER, Laura BUNGENER, Anke HUCKRIEDE, Daan J. A. CROMMELIN a Wim JISKOOT. *N*-Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, 2007, roč. 25, č. 1, s. 144-153. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.06.086.
80. SUBBIAH, Ramesh, Prakash RAMALINGAM a Subramaniyan RAMASUNDARAM. *N,N,N*-Trimethylchitosan nanoparticles for controlled intranasal delivery of HBV surface antigen. *Carbohydrate Polymers*. 2012, roč. 89, č. 4, s. 1289-1297.
81. VONGCHAN, Preeyanat, Yupanan WUTTI-IN, Warayuth SAJOMSANG, Pattarapond GONIL, Suchart KOTHAN a Robert J. LINHARDT. *N,N,N*-Trimethylchitosan nanoparticles for the delivery of monoclonal antibodies against hepatocellular carcinoma cells. *Carbohydrate Polymers*, 2011, roč. 85, č. 1, s. 215-220. DOI: 10.1016/j.carbpol.2011.02.018.
82. WANG, Siling, Tongying JIANG, Mingxin MA, Yanchen HU a Jinghai ZHANG. Preparation and evaluation of anti-neuroexcitation peptide (ANEP) loaded *N*-trimethyl chitosan chloride nanoparticles for brain-targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, 2010, roč. 86, č. 1, s. 249-255. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.002.
83. ZHAO, Xin, Lichen YIN, Jieying DING, Cui TANG, Shaohua GU, Chunhua YIN a Yumin MAO. Thiolated trimethyl chitosan nanocomplexes as gene carriers with high in vitro and in vivo transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 2010, roč. 44, č. 1, s. 46-54. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.022.
84. ZHANG, Jing, Cui TANG a Chunhua YIN. Galactosylated trimethyl chitosanecysteine nanoparticles loaded with Map4k4 siRNA for targeting activated macrophages. *Biomaterials*. 2010, roč. 34, č. 14, s. 3667-3677.
85. Absolute Molar Mass Characterisation. WYATT Technology Europe [online]. 2014 [cit. 2017-02-19].
86. IROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2 vyd., 2007, 574 s. ISBN: 978-047-0859-049.

87. HÁJEK, Milan. *Kvantitativní FT NMR spektroskopie v praxi*. 1. vyd. Praha: Academia, 1989, 164 s. ISBN 80-200-0096-8.
88. PATIL, J. S., M. V. KAMALAPUR a S. C. MARAPUR. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel Techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. *Nanomaterials*, 2010, č. 5, s. 241-248.
89. HAMILTON, V. et al. Bone cell attachment and growth on well-characterized chitosan films. *Polymer International*, 2007, roč. 56, č. 5, s. 641-47.
90. MANZ A., PAMME N., IOSSIFIDIS D. *Bioanalytical chemistry*. Londýn: Imperial College, 2004, 220 s. ISBN: 978-1860943713

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Použité zkratky

<i>Zkratka</i>	<i>Význam zkratky</i>
SEC-MALS	velikostně vylučovací chromatografie-statický rozptyl světla měřený ve více úhlech
IČ	infračervená spektroskopie
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
NMR	nukleární magnetická rezonance
DA	stupeň acetylace
DD	stupeň deacetylace
LVO	oblast lineární viskoelasticity
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SDS	dodecylsulfát sodný
STS	tetradecylsulfát sodný
DLS	dynamický rozptyl světla
CS	chitosan
TMC	<i>N,N,N</i> -trimethylchitosan
DMC	<i>N,N</i> -dimethylchitosan
DQ	stupeň kvarternizace
NMP	<i>N</i> -methyl-2-pyrrolidon
TEER	transepitelární elektrická rezonance
PAL	povrchově aktivní látka
CMC	kritická micelární koncentrace
CAC	kritická agregační koncentrace
PEC	polyelektrolytový hydrogel
TPP	thiamin pyrofosfát

ACO	akridinová oranž
WPI	syrovátkový proteinový izolát
TMEDA	<i>N,N,N',N'</i> -tetramethylethyldiamin
MBA	<i>N,N'</i> -methylenbisakrylamid
β -GP	β -glycerofosfátová sůl
APS	persulfát sodný

9.2 Použité symboly

<i>symbol</i>	<i>význam</i>	<i>jednotka</i>
t	čas	[s]
m	hmotnost	[g]
l	vzdálenost, prostorová souřadnice	[m]
p	tlak	[Pa]
T	teplota	[K]
F	síla	[N]
V	objem	[m ³]
A	plocha	[m ²]
λ_{max}	vlnová délka při nejvyšší hodnotě absorbance	[nm]
D	difúzní koeficient	[m ² ·s ⁻¹]
c	molární koncentrace	[mol·m ⁻³]
η	viskozita	[Pa·s]
G'	elastický modul	[Pa]
G''	viskózní modul	[Pa]
δ	ztrátový úhel	[°]
f	frekvence oscilací	[Hz]
A	absorbance	[-]
γ	amplituda napětí	[%]
w	hmotnostní koncentrace	[hm. %]
n	látkové množství	[mol]